



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la restricción alimentaria sobre la expresión de citocinas pro-inflamatorias en un modelo murino de *status epilepticus*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
JUAN JAIR SANTILLÁN CIGALES

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. GOHAR GEVORKIAN MARKOSIAN  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, DEPARTAMENTO DE  
INMUNOLOGÍA

DRA. LUISA LILIA ROCHA ARRIETA  
CINVESTAV, DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Abril 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer el enorme apoyo de mi familia. A mis amados padres que, con mucho sacrificio y esmero, siempre lo han dado todo para que pueda superarme cada día más. A mis hermanos, Cristian y Alyne, que siempre han sido mi motor para seguir adelante.

Agradezco especialmente a mi compañera, mi amiga, mi novia, Mariana López Filloy, por su infinito apoyo incondicional, por estar ahí para levantarme cuando más lo necesité, por siempre creer en mí, por todo su cariño y calidez en este tiempo.

Agradezco a mis queridos amigos y maestros, el Dr. Octavio Fabián Mercado Gómez, a la Dra. Susana González Reyes y QFB Virginia Selene Arriaga Ávila, por su ayuda técnica y el apoyo en mi formación académica, pero sobre todo por su amistad incondicional, la cual me han demostrado en los momentos difíciles, y por lo cual estaré eternamente agradecido. A los demás miembros del laboratorio que contribuyeron en múltiples formas para lograr lo que algún día me pareció imposible.

Agradezco a mi tutora, la Dra. Rosalinda Guevara Guzmán y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por haber permitido el desarrollo de mi formación académica en el laboratorio sensorial de la Facultad de Medicina, CU. Asimismo, agradezco a los miembros de mi comité tutorial asignados por el Programa de la Maestría en Ciencias Bioquímicas, la Dra. Gohar Gevorkian

Markosian y la Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta, por su paciencia y aportaciones a mi trabajo.

A mi comité jurado formado por el Dr. Ricardo Tapia Ibargüengoytia, el Dr. José Pedraza Chaverri, la Dra. Anahí Chavarría Krauser, la Dra. Agnès Odile Fleury y a la Dra. Magdalena Guerra Crespo, les hago un especial agradecimiento por su tiempo y dedicación para concretar mi trabajo de tesis.

Agradezco al programa de becas para posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), quien me otorgó el sustento durante el desarrollo de este proyecto. Los recursos para la realización de este proyecto fueron brindados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, (DGAPA-PAPIIT) (IN215716), por el CONACyT (239594) y por la Facultad de Medicina, UNAM, registro 001/2015. Este trabajo fue presentado en tres congresos, con el apoyo brindado por el Programa de Apoyo a los estudios del Posgrado, (PAEP) y la Sociedad Mexicana de Bioquímica (SMB):

1. En el XLVI congreso anual de la Sociedad para las Neurociencias (SfN, por sus siglas en ingles), realizado en noviembre de 2016, en la ciudad de San Diego, EUA.
2. En el XXXI congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, realizado en noviembre de 2016, en la ciudad de Aguascalientes, México.
3. En el XLVII congreso anual de la SfN, realizado el 15 de noviembre del 2017, en la ciudad de Washington D.C., EUA.

## Tabla de contenido

<b>1. Abreviaciones</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Resumen</b> .....	<b>8</b>
<b>3. Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>4. Antecedentes</b> .....	<b>10</b>
4.1 Epilepsia .....	10
4.2 <i>Status epilepticus (SE)</i> .....	11
4.3 Tratamientos .....	12
4.3.1 <i>Farmacológicos</i> .....	12
4.3.2 <i>Terapias Metabólicas</i> .....	13
4.3.3 <i>Restricción alimentaria</i> .....	17
4.4 Neuroinflamación en epilepsia .....	18
<b>5. Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>6. Hipótesis</b> .....	<b>24</b>
<b>7. Objetivos</b> .....	<b>24</b>
7.1 Objetivo general.....	24
7.2 Objetivos particulares .....	24
<b>8. Material y métodos</b> .....	<b>25</b>
8.1 Diseño experimental .....	25
8.1.1 <i>Sujetos de estudio</i> .....	25
8.1.2 <i>Régimen alimentario (Restricción alimentaria)</i> .....	26

8.2 Evaluación nutricional .....	26
8.3 Modelo de crisis convulsivas agudas (SE) y obtención del tejido .....	27
8.4 Evaluación del mRNA .....	28
8.4.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA .....	28
8.4.2 qRT-PCR.....	30
8.5 Cuantificación proteica de las citocinas .....	31
8.6 Inmunofluorescencias .....	32
8.6.1 FluoroJade C.....	32
8.6.2 Gliosis reactiva .....	33
8.7 Análisis estadístico .....	34
<b>9. Resultados .....</b>	<b>35</b>
9.1 Evaluación nutricional .....	35
9.2 Marcadores de neuroinflamación.....	40
9.2.1 Expresión de genes mediante qRT-PCR.....	40
9.2.2 Cuantificación de citocinas proinflamatorias.....	47
9.2.3 Evaluación de muerte neuronal .....	49
9.2.4 Evaluación de gliosis reactiva .....	59
9.2.5 Evaluación de la microglial .....	71
<b>10. Resumen de resultados .....</b>	<b>82</b>
<b>11. Discusión .....</b>	<b>86</b>
10.1 Efecto de la restricción alimentaria en el estado de nutrición .....	86
10.2 Efecto de la restricción alimentaria en la producción de citocinas inflamatorias durante el SE.....	88

10.3 Efecto de la restricción alimentaria en la muerte neuronal y gliosis reactiva durante el SE.....	92
10.4 Efecto de la restricción alimentaria sobre la microglía en el SE.....	95
<b>12. Integración .....</b>	<b>96</b>
<b>13. Conclusión .....</b>	<b>99</b>
<b>14. Referencias .....</b>	<b>100</b>

## 1. Abreviaciones (En orden alfabético)

<b>AL</b>	Ad libitum
<b>AMPA</b>	Receptor del ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato
<b>BHB</b>	$\beta$ -hidroxibutirato
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b><math>\beta</math>-Ox</b>	$\beta$ -oxidación de ácidos grasos
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>cDNA</b>	Cadena complementaria (una hebra) de DNA
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DC</b>	Dieta cetogénica
<b>DEPC</b>	Pirocarbonato de etilo (por sus siglas en inglés)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés)
<b>ELT</b>	Epilepsia del lóbulo temporal
<b>ELTM</b>	Epilepsia del lóbulo temporal mesial
<b>ETM</b>	Esclerosis temporal mesial
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>FFA</b>	Ácidos grasos libres (por sus siglas en inglés)
<b>GABA</b>	Ácido gamma-aminobutírico
<b>GD</b>	Giro dentado



<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial (por sus siglas en inglés)
<b>Iba-1</b>	Molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1
<b>ILAE</b>	Liga internacional contra la epilepsia
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IntDen</b>	Densidad de píxeles integrada
<b>K-ATP</b>	Canales de ATP sensibles a potasio
<b>MCT</b>	Transportador de monocarboxilatos
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>NEFA</b>	Ácidos grasos no esenciales
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (por sus siglas en inglés)
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>PBS</b>	Amortiguador salino de fosfatos
<b>PPAR</b>	Receptores Activados por Proliferadores Peroxisomales
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (por sus siglas en inglés)
<b>RA</b>	Restricción alimentaria
<b>SE</b>	<i>status epilepticus</i>
<b>SEM</b>	Error medio estándar
<b>SMCT</b>	Receptor de monocarboxilatos dependiente de sodio
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central

<b>TAE</b>	Amortiguador formado por trisaminometano, acetato y ácido etilendiaminotetraacético
<b>TAG</b>	Triacilgliceroles o triglicéridos
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$

## 2. Resumen.

La epilepsia se caracteriza por el desarrollo de convulsiones recurrentes y espontáneas. Su etiología es multivariada, pero la mayoría de los pacientes presentan como primera manifestación un *status epilepticus* (SE), definido como una falla en los mecanismos de inicio y terminación de una convulsión. En la fisiopatología del SE y la epilepsia, hay procesos inflamatorios que contribuyen a su cronicidad. Los tratamientos actuales controlan las crisis convulsivas, pero no evitan la progresión de la enfermedad. Por otro lado, algunas terapias metabólicas tienen propiedades antiepilépticas, por lo que se ha propuesto retomar su uso y desarrollo. La restricción alimentaria (RA) podría funcionar como terapia, porque además de tener un efecto antiepiléptico, no tiene los efectos secundarios de una dieta cetogénica. El objetivo de este proyecto es evaluar el efecto de la RA en un modelo murino sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en un curso temporal post-SE. Para la inducción del SE, se usó el modelo de litio-pilocarpina. Se evaluó el estado de nutrición cuantificando dos proteínas séricas y una biometría hemática. Las citocinas proinflamatorias se midieron con ELISA y qRT-PCR. Se evaluó la muerte neuronal con tinción de FluoroJade C, también se midió gliosis reactiva y activación de la microglía con inmunofluorescencias (GFAP e Iba-1). Se encontró que la RA no produce un efecto severo de desnutrición, pero sí modula de manera directa el proceso neuroinflamatorio al reducir la expresión de citocinas inflamatorias. Además, la RA mejora la cantidad y distribución del sistema inmune residente (astrocitos y microglía). Se concluye que la RA induce protección en los animales durante el desarrollo del SE y en el período latente.

### **3. Abstract.**

Epilepsy is characterized by the development of recurrent and spontaneous seizures. Although its etiology can be multivariate, most patients present as a first manifestation a status epilepticus (SE), which is defined as a failure in the mechanisms of initiation and termination of seizure. Within pathophysiology of SE and epilepsy itself, there are inflammatory processes that contribute to chronicity. Current treatments control seizures; however, they do not prevent the progression of the disease. For which it is recommended to retake the use and development of metabolic therapies. The daytime-restricted feeding (DRF) could work as therapy, because apart of having an antiepileptic effect, it does not have the side effects of a ketogenic diet. The objective of this project is evaluate the effect of DRF on the expression of proinflammatory cytokines in a post-SE temporal course. For the induction of SE, the lithium-pilocarpine model was used. Nutritional status was evaluated by quantifying albumin, transthyretin and blood count. Proinflammatory cytokines were measured with ELISA and qRT-PCR. Neuronal death was evaluated with Fluoro Jade C staining, and reactive gliosis and activation of microglia were measured with immunofluorescence against GFAP and Iba-1, respectively. The DRF does not produce a severe effect of malnutrition, but does directly modulate the neuroinflammatory process by reducing expression of inflammatory cytokines. In addition, DRF improves quantity and distribution of resident immune system (astrocytes and microglia). In conclusion, DRF induces protection in animals during the development SE and in latent period.

#### **4. Antecedentes.**

##### 4.1 Epilepsia.

La epilepsia es un trastorno cerebral que se caracteriza por una predisposición persistente a generar convulsiones espontáneas, además de producir alteraciones neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales. El diagnóstico de epilepsia requiere de la aparición de, al menos, una convulsión epiléptica no provocada, la cual se define como un evento transitorio de signos y/o síntomas, mediados por una actividad neuronal anormal excesiva o sincrónica en el cerebro (Fisher et al., 2014).

Existen diversos tipos de epilepsia, de etiología multifactorial, lo que hace que su clasificación sea amplia, debatida, y modificada constantemente. La epilepsia del lóbulo temporal (ELT) es la forma más común de epilepsia focal en la edad adulta y la estructura que se afecta principalmente es el hipocampo. Entre estos pacientes, la esclerosis temporal mesial (ETM, llamada también esclerosis del hipocampo) es la anomalía histopatológica subyacente más común. La importancia de esta característica reside en su asociación con las formas de ELT refractarias a los tratamientos convencionales (AlQassmi et al., 2016; Berg, 2008). De acuerdo con la liga internacional contra la epilepsia (ILAE, por sus siglas en inglés), la epilepsia farmacorresistente puede definirse como la falta de una respuesta adecuada, ante dos esquemas con medicamentos antiepilépticos elegidos, tolerados y utilizados apropiadamente (ya sea como monoterapia o en combinación) para lograr una remisión de las crisis de manera sostenida (Kwan et al., 2010).

La ELT tiene una etiología multifactorial y dentro de las principales causas se encuentran: los traumatismos craneoencefálicos, la enfermedad cerebro vascular, infecciones neurológicas, tumores cerebrales y daños encefálicos por causas prenatales y perinatales (Devinsky et al., 2013). Solamente un pequeño porcentaje de estos pacientes presentan mutaciones genéticas como causa principal de la enfermedad (Staley, 2015) y gran parte de los pacientes pueden iniciar con un síndrome de crisis prolongadas, denominado *status epilepticus* (SE) (Trinka et al., 2015).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de 50 millones de personas padecen epilepsia, siendo así la causa neurológica más común de muerte y solo alrededor del 70% de estos pacientes tienen una respuesta favorable al tratamiento farmacológico (<https://www.who.int/es>).

#### 4.2 *Status epilepticus*.

Históricamente, la ILAE y otros definieron clínicamente al SE como una única crisis epiléptica de más de 30 minutos de duración o una serie de crisis epilépticas durante las que no hay recuperación de la consciencia (función) entre cada evento ictal, en un período de 30 minutos (ILAE, 1993). Actualmente, este se define como una condición que resulta de un fallo en los mecanismos responsables de la terminación de las crisis o el inicio de mecanismos que conducen a convulsiones anormalmente prolongadas. Es un evento agudo que puede tener consecuencias a largo plazo incluyendo la lesión, muerte neuronal, además de alteración de las redes

neuronales, dependiendo del tipo y la duración de las convulsiones (Trinka et al., 2015). Siendo así, el SE es considerado una emergencia médica y neurológica, que requiere de evaluación y tratamiento inmediato.

La importancia que adquiere el estudio de esta condición neurológica se encuentra en su asociación con el desarrollo y la fisiopatología de la epilepsia. Durante el SE, se alteran distintos procesos encargados de mantener una homeostasis en el sistema nervioso central (SNC), lo cual favorece la presencia crónica de convulsiones (Trinka et al. 2015; Scorza et al. 2009). Es por esta razón que el estudio del SE, tanto en humanos como en modelos animales, contribuye a obtener información clave para entender los componentes involucrados en su fisiopatología y de esta manera contribuir a la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas.

#### 4.3 Tratamientos.

##### *4.3.1 Farmacológicos.*

La epilepsia es considerada un problema de salud pública debido a su prevalencia, aunado al incremento de pacientes con farmacoresistencia en México y en el mundo. La industria farmacéutica ha desarrollado una gran cantidad de fármacos anticonvulsivos; sin embargo, estos medicamentos logran controlar solamente los principales signos y síntomas del 70% de los pacientes que sufren epilepsia (Loscher et al., 2013). Desafortunadamente, estos medicamentos no son capaces de curar la epilepsia y su función primordial es controlar las convulsiones que son su principal síntoma. Un aspecto particularmente inquietante de los tratamientos

actuales es que no se han hecho progresos sustanciales en el control de las crisis, desde hace 40-50 años con la introducción de los fármacos principalmente utilizados en la actualidad como son la carbamazepina, el valproato y la difenilhidantoína, entre otros (Loscher et al., 2013).

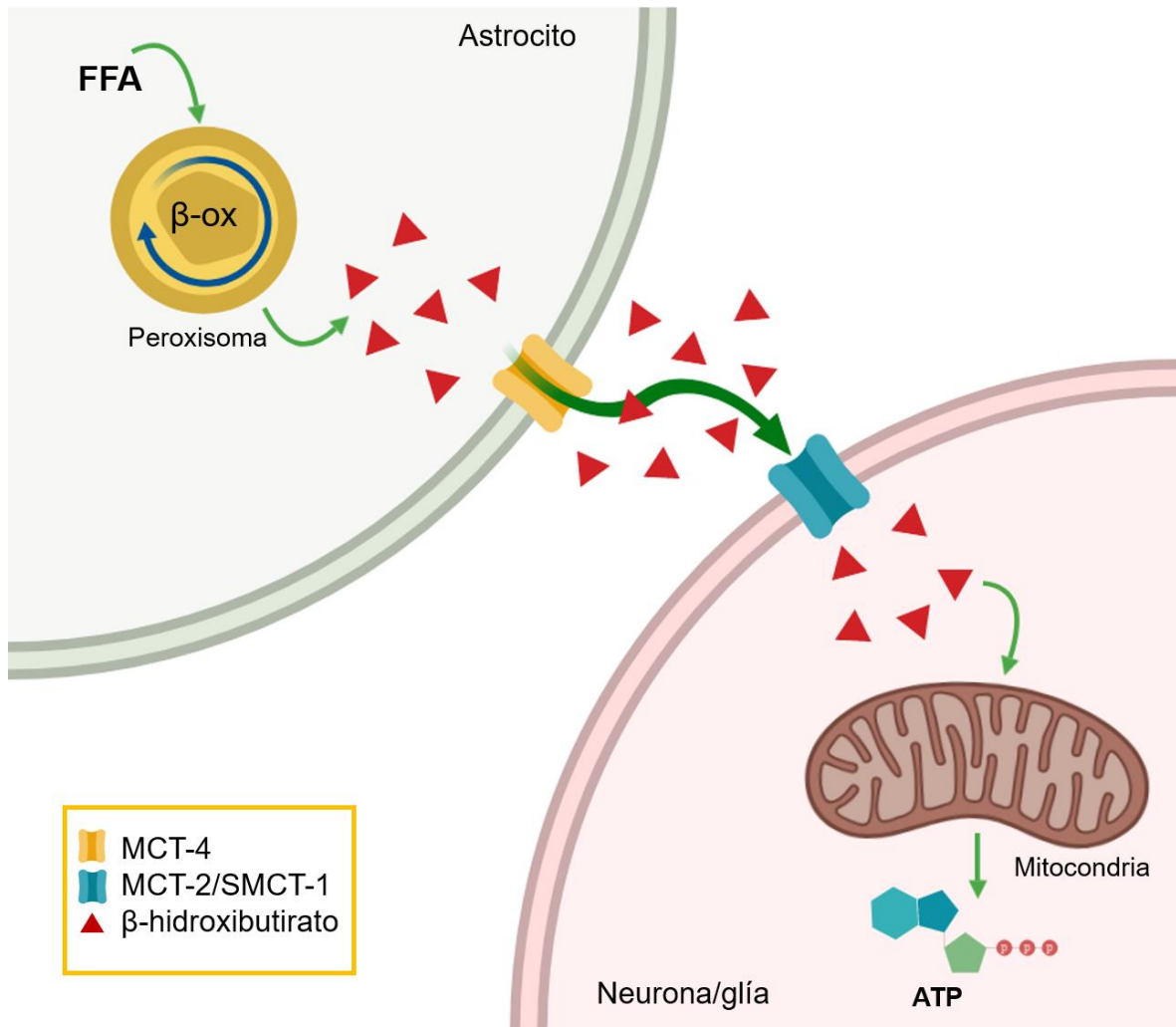
La ELT no es un trastorno uniforme ya que, mientras que muchos pacientes tienen una forma severa resistente a fármacos, otros tienen un trastorno epiléptico mucho más leve y son capaces de alcanzar periodos indefinidos de remisión con o sin medicamentos antiepilépticos (AlQassmi et al., 2016). Por otro lado, la epilepsia del lóbulo temporal mesial (ELTM) se ha considerado desde hace mucho tiempo una forma de epilepsia adquirida, severa, resistente a fármacos, así como la principal indicación para la resección quirúrgica de los focos epilépticos (Loscher et al., 2013; Berg, 2008). Por estas razones emerge la necesidad de buscar nuevas terapias alternativas como las terapias metabólicas.

#### *4.3.2 Terapias metabólicas.*

La dieta cetogénica (DC) es una dieta rica en ácidos grasos, un porcentaje medio de proteínas y baja en carbohidratos, que se ha empleado como tratamiento para la epilepsia refractaria por más de 90 años. Esta terapia "alternativa" se diseñó originalmente para imitar los cambios bioquímicos asociados con el ayuno, un tratamiento descrito anecdóticamente, desde la época hipocrática, para controlar la actividad convulsiva (Wilder, 1921; Wheless, 2008). Los rasgos distintivos del tratamiento con DC son la producción de cuerpos cetónicos ( $\beta$ -hidroxibutirato [BHB],



acetoacetato y acetona) durante la oxidación de ácidos grasos en el hígado, y niveles reducidos de glucosa en sangre. Debido a la reducción de glucosa como fuente energética, los cuerpos cetónicos proporcionan un sustrato alternativo a la glucosa para la obtención de energía, reduciendo el metabolismo glucolítico y aumentando la oxidación de ácidos grasos a nivel mitocondrial (Esquema 1) (Masino & Rho, 2012; Panov et al., 2014). Este efecto metabólico también se ha reportado en cerebro durante condiciones de ayuno y en este caso en particular, el BHB es transportado desde la barrera hematoencefálica (BHE) hacia el intersticio cerebral a través de transportadores de monocarboxilatos-1 (MCT-1); de igual manera los astrocitos producen BHB, mediante la  $\beta$ -oxidación ( $\beta$ -Ox) de ácidos grasos libres (FFA) y son transportados hacia las neuronas y resto de células que lo demandan, a través de los canales MCT-4, que a su vez son captados en las células que lo requieren por los transportadores MCT-2 y los transportadores de monocarboxilatos dependientes de sodio-1 (SMCT-1) (Achanta & Rae, 2017).



**Esquema 1. Producción de BHB en cerebro.** Durante condiciones de ayuno los astrocitos son los encargados de suplir las necesidades energéticas del cerebro, a través de la producción de BHB dentro de los peroxisomas y transportándolo a través de canales específicos (MCT) hacia las células que lo requieren. MCT-4: transportador de monocarboxilatos; SMCT-1: transportador de monocarboxilatos dependiente de sodio-1; ATP: Adenosin trifosfato.

Por otra parte, se ha reportado que los cuerpos cetónicos pueden inhibir directamente el transporte de glutamato vesicular, y que también podrían producir cambios importantes en el metabolismo celular que reduzcan las convulsiones (Juge et al. 2010; Lutas et al., 2013). Este cambio metabólico puede conducir a la activación de los canales de ATP sensibles a potasio (K-ATP), los cuales pueden reducir la excitabilidad neuronal (Ma et al., 2007). La evidencia reciente sugiere que

la actividad elevada de K-ATP ocurre con oxidación reducida de la glucosa, y esta actividad aumentada confiere resistencia a las convulsiones. También se ha demostrado que la reducción de la glucólisis mediante el desplazamiento del metabolismo de la glucosa a la vía de las pentosas fosfato reduce las convulsiones, posiblemente mediante un manejo mejorado de las especies reactivas de oxígeno (ERO) (Lutas et al., 2013). Además, se ha demostrado que el BHB posee propiedades anti-inflamatorias, específicamente inhibiendo la activación del inflamasoma al interactuar con la subunidad NLRP3, como lo demostraron Youm et al. en 2015. En 2017 Goldberg et al., corroboraron el mismo efecto antiinflamatorio del BHB en un modelo de gota.

Asimismo, se ha demostrado que diversos regímenes alimentarios basados en una restricción calórica ejercen un efecto anticonvulsivo similar al de la dieta cetogénica (Viggiano et al., 2016). En la actualidad, la restricción calórica sigue siendo reconocida por tener muchos efectos positivos sobre la longevidad, la diabetes, la hipertensión, la enfermedad cardiovascular y el cáncer (Rizza et al., 2014).

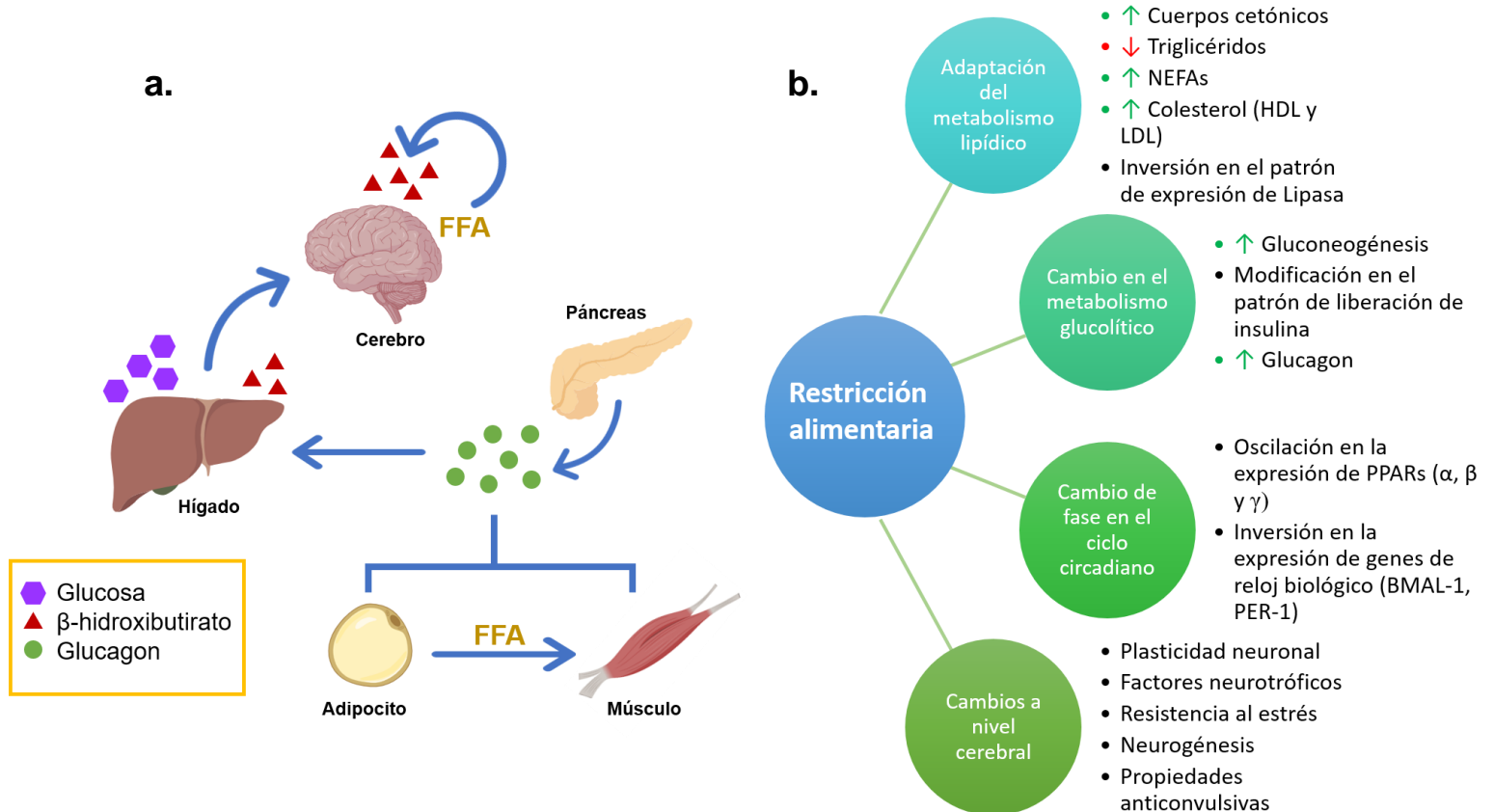
Actualmente el uso clínico de estas terapias es muy controversial, debido a que éstas requieren de atención médica especializada, además de tener distintos efectos adversos. Dentro de los efectos negativos de estas terapias se encuentran: hipoglicemia, hiperlipidemia, cetoacidosis y pérdida de peso corporal de manera abrupta, entre otras (Bielohuby et al., 2013; Nei et al., 2014).

#### 4.3.3 Restricción alimentaria.

Otro tratamiento alternativo es la restricción alimentaria (RA), el cual representa un reto nutricional en el que se limita la disponibilidad de la comida por distintos periodos de tiempo, durante la fase activa de los organismos, sin restringir el aporte calórico (Bellet & Sassone-Corsi, 2010). El efecto metabólico que produce la RA ya ha sido estudiado y se han descrito algunas de sus características (Esquema 2) como: una readaptación del metabolismo de los ácidos grasos (por ejemplo, un aumento de ácidos grasos no esenciales [NEFA] y cuerpos cetónicos a nivel sérico y hepático, una reducción de triacilgliceroles [TAG] previo a la ingesta de alimento, entre otros) (Rivera-Zavala et al., 2017), aumento en la actividad gluconeogénica (Perez-Mendoza et al., 2014), cambios en la expresión génica del ciclo circadiano y oscilación en la expresión de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs, por sus siglas en inglés) (Rivera-Zavala et al., 2011). Estos cambios involucran una readaptación endocrinológica y metabólica en el organismo, para mantener un estado homeostático y maximizar la disposición energética de alimento (Arellanes-Licea et al., 2014). También se han informado de sus propiedades en cerebro, dentro de los cuales incrementa la cantidad de factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) que cumple la función como factor de crecimiento neuronal (Duan et al., 2001), y por consecuente incrementa la neurogenesis (Lee et al., 2000) y plasticidad neuronal (Mattson et al., 2003).

Asimismo, se ha observado que la RA ejerce efectos anticonvulsivos similares a los obtenidos con una DC. Reduce la actividad epileptiforme, aumenta el tiempo de

latencia a la siguiente convulsión, disminuye la severidad de las crisis durante el SE, mantiene niveles séricos elevados de BHB y promueve un estado energéticamente estables del organismo (Landgrave-Gómez et al., 2016).



**Esquema 2. Propiedades de la restricción alimentaria.** En (a) se puede observar el ciclo de generación de BHB en condiciones de ayuno (RA). En (b) se resumen los diferentes cambios metabólicos reportados de la RA.

#### 4.4 Neuroinflamación en epilepsia.

La inflamación es una repuesta fisiológica normal ante un daño, ya sea por infección, traumatismo, mecanismos autoinmunes o estrés biológico. Está caracterizada por la producción de mediadores inflamatorios de las células inmunes

residentes del tejido o de la circulación adyacente e involucra la activación de la inmunidad innata y adaptativa (Becher et al., 2000).

Debe existir un equilibrio preciso en la limitación de los procesos inflamatorios, para mantener un adecuado funcionamiento del organismo y evitar la progresión de un daño. Por ello, la participación de muchas de estas moléculas inflamatorias, no resultan perjudiciales en condiciones normales. Sin embargo, un desequilibrio de estos mediadores a nivel cerebral puede afectar de manera directa o indirecta la excitabilidad neuronal. Como resultado se genera una condición deletérea que provoca la reorganización de redes neuronales, teniendo como resultado la disfunción e incluso la muerte celular, contribuyendo así a la epileptogénesis (Vezzani et al., 2013).

Asimismo, cada vez es más frecuente el hallazgo de procesos neuroinflamatorios en pacientes con farmacorresistencia, por lo que se plantea la posibilidad de reconocer a este proceso como limitante para obtener un control más adecuado de esta patología. Se ha propuesto que la neuroinflamación, puede ser uno de los mecanismos que contribuye al daño neuronal producido durante las crisis agudas (como lo es el caso del SE) y en la epilepsia ya establecida (etapa crónica) (Vezzani et al., 2013).

Cambios en algunas moléculas proinflamatorias como la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ciclooxigenasa (COX) y

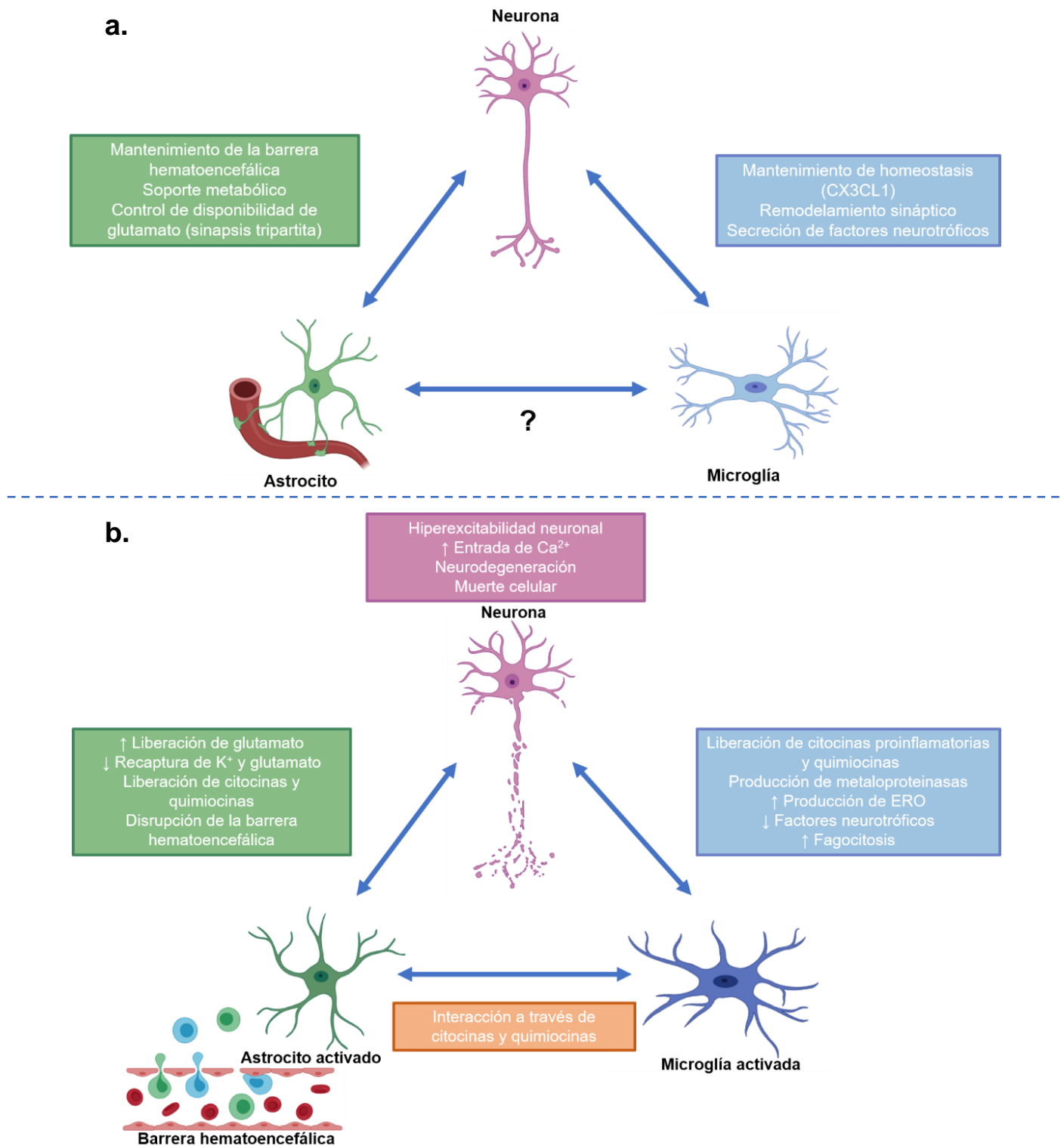
prostaglandinas, por mencionar algunas, además de astrocitosis reactiva y activación de la microglía, han sido descritos en pacientes con ELT (Lorigados et al., 2013). Se ha descrito que la presencia de estas citocinas proinflamatorias altera las comunicaciones neurogliales (Aronica et al., 2012; Devinsky et al., 2013), además de favorecer la hiperexcitabilidad neuronal por alteraciones en la expresión de receptores de neurotransmisores como glutamato y ácido gama-aminobutírico (GABA) (Vezzani et al., 2015). En otros estudios se ha demostrado la participación de la IL-1 $\beta$  en la modulación del proceso convulsivo; su presencia aumenta la duración de la actividad eléctrica anormal producida por una convulsión, y a su vez promueve una predisposición para la generación de nuevas convulsiones, al reducir el tiempo de latencia entre cada una de ellas (Tao et al., 2015). De igual manera se ha informado de la participación citocinas promoviendo cambios en la expresión de receptores y la liberación de glutamato, alterando su composición por activación de cinasas de proteína (Stellwagen et al. 2005; Balosso et al. 2009). Específicamente IL-1 $\beta$  activa receptores NMDA, y TNF- $\alpha$  activa receptores AMPA (Balosso et al., 2009; Rana & Musto, 2018) y de esta forma contribuyen al desarrollo de epilepsia.

Por otro lado, la participación del sistema inmune residente del SNC juega un papel muy importante en la mediación del daño, durante y posterior, a una crisis epiléptica, de modo que, una regulación inadecuada en la activación de este sistema celular favorece la progresión del daño. En este sentido, se ha descrito que la actividad microglial tiene un gran impacto sobre la remoción de terminales sinápticas disfuncionales en las neuronas, durante procesos patológicos; además de permitir

la plasticidad y supervivencia neuronal, debido a su interacción continua a través de quimiocinas (Salter & Beggs, 2014).

Siendo así, las neuronas mantienen una comunicación estrecha con la microglía al expresar de manera constitutiva sobre su membrana a la quimiocina CX3CL1, la cual interactúa con su receptor CX3CR1 presente en la microglía. Esta interacción es interpretada como una señal de quiescencia en un tejido sano (Zujovic et al., 2000; Mizuno et al., 2003). No obstante, la ausencia de CX3CL1 en las neuronas representa un indicador para que la microglía sea activada y promueve un estado inflamatorio (Esquema 3). De este modo, cualquier disfunción neuronal es acompañada de activación microglial con un incremento en su actividad fagocítica y proinflamatoria, y en consecuencia hay un aumento en la muerte neuronal (Cardona et al., 2006; He et al., 2019). Asimismo, se ha documentado el papel que tienen los astrocitos sobre la modulación de la actividad sináptica y las consecuencias que implica la pérdida de su integridad (Esquema 3) (Burda & Sofroniew 2014; Sofroniew 2014; Wanner et al. 2013).





**Esquema 3. Relación astrocyto-neurona-microglía.** En (a) se observa la interacción normal entre neuronas, astrocytos y microglía; mientras que en (b) se esquematizan los cambios que surgen después de que se presenta una convulsión.

En distintos estudios, con diferentes modelos de crisis epilépticas, se ha corroborado la presencia de inflamación desde periodos tempranos (Shapiro et al., 2008; Patterson et al. 2015), incluso cuando no hay cambios en la morfología de la microglía (Ziebell et al. 2015). De ahí surge el interés de evaluar diferentes moléculas inflamatorias en periodos tempranos, con la intención de obtener datos útiles para el desarrollo de terapias que permitan limitar y evitar la progresión del daño. Como se ha referido anteriormente, el estudio de la neuroinflamación requiere de la evaluación conjunta de diversos marcadores, tanto la cantidad de la proteína presente en el tejido lesionado, como la cantidad de ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de citocinas proinflamatorias, así como la participación de las células residentes durante la respuesta inmune.

## **5. Justificación.**

Debido al problema de salud pública que representa la epilepsia a nivel mundial, y considerando que la mayor parte de la población afectada se encuentra en países en vías de desarrollo (como lo es México); así como el acceso limitado de la población a servicios de atención médica adecuada con opciones terapéuticas, resulta muy importante investigar terapias alternativas, que intervengan en la reducción de los procesos patológicos (como lo es la neuroinflamación) para limitar la progresión de la neurodegeneración y mejorar la calidad de vida en los pacientes, sin que represente un riesgo potencial y un gasto económico importante.

Por ello, la evaluación de terapias metabólicas, como tratamiento complementario, en modelos animales, constituye una pieza sustancial para su posible uso en humanos.

## **6. Hipótesis.**

El efecto anti-convulsivo de la restricción alimentaria, podría deberse a una modulación del proceso inflamatorio durante las crisis agudas.

## **7. Objetivos.**

### 7.1 Objetivo general.

Determinar el efecto de la restricción alimentaria sobre la producción de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de *Status Epilepticus*.

### 7.2 Objetivos particulares.

1. Evaluar el estado nutricional que genera la restricción alimentaria en comparación con un régimen alimentario "*ad libitum*", previo a la inducción de SE.
2. Medir la expresión del mRNA y la cantidad de proteína, de citocinas y quimiocinas implicadas en inflamación (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-10, NF $\kappa$ B-

1, NF $\kappa$ B-2, CX3CL1, CXCL1, CXCL10) en hipocampo, a través de un curso temporal (3 h, 12 h, 24 h y 5 días) posterior a la inducción de SE.

3. Evaluar la muerte neuronal y gliosis reactiva en hipocampo mediante técnicas de inmunocitoquímica (inmunofluorescencias contra Fluoro-JadeC, Iba-1 y GFAP), 24 h y 5 días posteriores a la inducción de SE.

## **8. Material y métodos.**

### 8.1 Diseño experimental.

#### 8.1.1 Sujetos de estudio.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso aproximado de  $200 \pm 20$  g obtenidas del bioterio de la Facultad de Medicina UNAM, las cuales se mantuvieron a temperatura constante (25°C) y con ciclos de luz-oscuridad de 12 h. Los animales se alimentaron con dieta estándar adquirida de Lab Diet Rodent Laboratory Diet 5001 pellets (PMI Nutrition International, Inc., Brentwood, MO, EUA). Todos los protocolos experimentales para el uso de animales se realizaron bajo los lineamientos de la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con base en las directrices y recomendaciones de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para minimizar el número de animales y sufrimiento.

### 8.1.2 Régimen alimentario.

La metodología del régimen alimentario ya se ha publicado en trabajos previos (Arellanes-Licea et al., 2014; Rivera-Zavala et al., 2017; Perez-Mendoza et al., 2014; Langrave-Gomez et al., 2016). En este trabajo los animales se dividieron en 4 grupos (n=6 por grupo):

- a) Grupo *ad libitum* (AL): alimentados a libre demanda con dieta estándar y agua durante 21 días.
- b) Grupo con restricción alimentaria (RA): con 22 horas de ayuno y alimentados dos horas al día (a la mitad de su ciclo de luz, de 12:00 a 14:00 h) con dieta estándar y agua a libre demanda durante 21 días.
- c) Grupo alimentado en condiciones AL, al cual se le indujo SE (ALSE) con pilocarpina al día 21 (véase abajo).
- d) Grupo sujeto a RA con inducción de SE al día 21 (RASE).

### 8.2 Evaluación nutricional.

Se monitoreó diariamente el peso de todos los animales a las 12:00 h, durante 21 días consecutivos. El día que fueron eutanasiados, se indujo anestesia con pentobarbital sódico y se obtuvo sangre de los grupos AL y RA, mediante punción intracardiaca, la cual fue recolectada en tubos Vacutainer para realizar biometrías hemáticas y separación de plasma (BD Vacutainer, BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, EUA). Las muestras para biometrías hemáticas se enviaron a un laboratorio

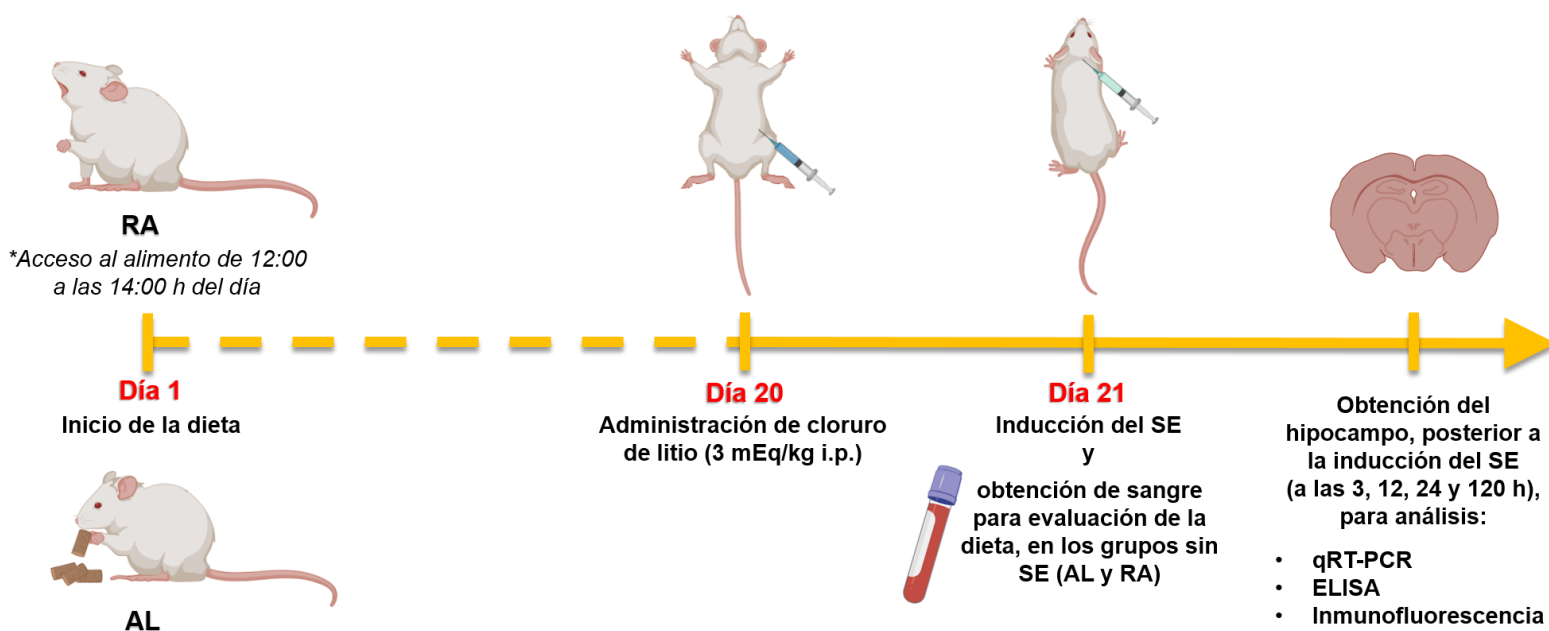
especializado (Master-Lab) para su adecuado procesamiento (los valores de referencia para la especie y edad se obtuvieron de Weiss DJ, Wardrop KJ. 2010. Schlam Veterinary Hematology). El plasma obtenido se usó para medir dos proteínas: transtiretina y albúmina mediante ensayos de ELISA (Aviva OKIA00159 y Abcam ab108790, respectivamente) siguiendo las instrucciones del fabricante, con la finalidad de obtener un parámetro nutricional adicional.

### 8.3 Modelo de crisis convulsivas agudas (SE) y obtención del tejido.

Para el modelo de SE, se le inyectó cloruro de litio (3 mEq/kg, i.p.) a los animales en el día 20; 18 h después, recibieron una inyección de metil-nitrato de escopolamina (1 mg/kg, s.c.) para minimizar los efectos colinérgicos periféricos de la pilocarpina; y 30 min después, se administró pilocarpina a una dosis de 60 mg/kg, s.c. para inducir SE, el cual se observó durante 90 min. Inmediatamente después, los animales recibieron una inyección de diazepam (Valium, 5 mg i.m.) para detener las contracciones tónico-clónicas. Se realizó el mismo procedimiento con los animales de los grupos AL y RA, pero estos recibieron una inyección de solución salina (0.9%) en lugar de pilocarpina.

Posteriormente, a la inyección de diazepam, los animales de los grupos ALSE y RASE, se eutanizaron a las 3 h, 12 h y 24 h por decapitación, previamente inyectados con una sobredosis de pentobarbital sódico (26 mg/kg) para evitar el sufrimiento. Se obtuvo el tejido cerebral por disección craneal, del cual se separaron los hipocampos y a su vez se almacenaron en amortiguador de lisis o Trizol, según

fuera el caso, para realizar los análisis bioquímicos. Para el caso la inmunofluorescencia véase más adelante.



**Esquema 4. Resumen de metodología.** En el día 1 se iniciaron ambos regímenes alimenticios hasta el día 20, en el cual se inició el protocolo para la inducción del SE en los grupos ALSE y RASE. En el caso de los grupos sin SE (AL y RA) se obtuvo una muestra de sangre en el día 21 para los respectivos análisis de la dieta. Posterior a la inducción del SE (grupos ALSE y RASE) se obtuvieron los hipocampos a las 3, 12, 24 h y 5 días, para los análisis bioquímicos y de biología molecular.

## 8.4 Evaluación del mRNA.

### 8.4.1 Extracción de RNA y síntesis de cDNA.

Los hipocampos se homogenizaron en tubos tratados previamente con una solución de dietil-pirocarbonato (DEPC) al 0.1%. El RNA total se aisló utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a las 3 h, 12 h y 24 h posterior a la inducción del SE. Las muestras se procesaron con el estuche de reactivos DNA-free™ DNase Treatment and

Removal Reagents (Ambion por Life Technologies-Thermo Fisher Scientific, EUA) para eliminar la contaminación con DNA genómico.

La integridad y pureza del RNA se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y por la relación de espectroscopía (260/280 nm), respectivamente. En el caso del gel de agarosa al 1% se disolvió agarosa en agua tratada con DEPC estéril mezclado con 5  $\mu$ L de GelRed Nucleic Acid (Gel stain, Biotium), se dejó gelificar durante 15 minutos y se colocaron las muestras preparadas de la siguiente forma: 1  $\mu$ L de RNA, 1  $\mu$ L de amortiguador de carga (Invitrogen, 10x bluejuice) y 8  $\mu$ L de agua libre de nucleasas (Water nuclease free, Life Technologies-Thermo Fisher Scientific, EUA). Adicionalmente, se agregó un marcador de peso molecular (TrackIt 100bp DNA ladder, Invitrogen) en el primer carril para usarlo como referencia; posteriormente se corrió con 350 mL de amortiguador TAE 1x (Invitrogen) + H<sub>2</sub>O DEPC a 90 Volts por 45 minutos y se observó la presencia de bandas integras correspondientes al RNA ribosomal 28S y 18S bajo luz ultravioleta en un equipo transiluminador MiniBIS Pro (Bio-Imaging Systems).

Para el caso de la espectroscopía se colocaron 2  $\mu$ L de cada muestra de RNA en el dispositivo Take3 (BioTek), y se hizo la lectura en el equipo Epoch (BioTek) tomando como referencia una relación de las longitudes 260/280 nm entre 1.8 y 2. Para confirmar la calidad del mRNA se hicieron ensayos RNAnano Chip y de esta manera obtener un parámetro cuantitativo, utilizando sólo aquellas muestras que tuvieron un RIN>7 (RNA Integrity Number). Se utilizaron dos microgramos de RNA



total para sintetizar la primera cadena de cDNA utilizando el kit Thermo Scientific First Strand cDNA Synthesis con MLV-Reverse Transcriptase.

#### 8.4.2 qRT-PCR.

Para medir la expresión génica se utilizó el sistema de Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems de Thermo Fisher Scientific, EUA) con sondas prediseñadas para cada gen (Tabla 1). Como control interno se utilizó  $\beta$ -actina. La expresión de cada gen se cuantificó en el equipo Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego CA, EUA).

<b>Gen</b>	<b>ID</b>
<b><math>\beta</math>-Actina</b>	Rn00667869_m1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Rn00580432_m1
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Rn01525859_g1
<b>IL-6</b>	Rn01410330_m1
<b>IL-4</b>	Rn01456866_m1
<b>IL-10</b>	Rn01483988_g1
<b>NFKB-1</b>	Rn01399572_m1
<b>NFKB-2</b>	Rn01413842_g1
<b>CX3CL1</b>	Rn00593186_m1
<b>CXCL1</b>	Rn00578225_m1
<b>CXCL10</b>	Rn01413889_g1

**Tabla 1. ID de sondas Taqman.**

Para cada reacción se mezcló 1  $\mu\text{L}$  de cDNA (a una concentración de 200  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), con 0.5  $\mu\text{L}$  de la sonda específica para cada gen (por ensayo) y 5  $\mu\text{L}$  de Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Scientific, EUA). El volumen final se ajustó a 10  $\mu\text{L}$  con agua estéril y libre de endonucleasas. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: activación de la enzima a 95°C por 10 min (1 ciclo), seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 s y alineación y extensión a 50°C por 1 minuto.

#### 8.5 Cuantificación proteica de las citocinas.

Para tener un valor cuantitativo de la cantidad proteica de citocinas se utilizaron los siguientes ensayos de ELISA: ab100768 (Abcam) para IL-1 $\beta$ , ab100785 (Abcam) para TNF- $\alpha$  y BioAssay 152674 (USBiological) para IL-6. Para ello, se obtuvieron hipocampos (n=5) de cada grupo (AL, RA, ALSE y RASE) a las 3 h, 12 h, 24 h y 5 días después de la inducción del SE; posteriormente homogenizaron en amortiguador de lisis con inhibidores de fosfatasa y proteasas. Posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína mediante el uso de un kit con ácido bicinconínico y se hicieron diluciones para tener un rango homogéneo (250  $\mu\text{g}/\text{muestra}$ ) de proteína total para cada ensayo. Se utilizaron los kits de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

## 8.6 Inmunofluorescencias.

Para realizar las inmunofluorescencias se utilizaron 6 sujetos de los grupos AL y RA, ALSE y RASE 24 h y 5 días después de la inducción del SE, para posteriormente ser eutanasiados mediante perfusión intracardiaca. Inicialmente, se infundieron 250 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) para retirar la sangre, seguido de una infusión de 250 mL de paraformaldehído al 4%, con el propósito de fijar los tejidos. Se obtuvieron los cerebros completos mediante disección craneal. Luego se deshidrataron a través de gradientes de etanol (en el siguiente orden: 70%, 80%, 90%, etanol absoluto I y II) y xilol. Después se embebieron en parafina para ser cortados con micrótopo a un grosor de 5  $\mu\text{m}$  y se colocaron en portaobjetos tratados previamente con poli-L-lisina.

Una vez obtenido el corte, se desparafinaron los tejidos (20 minutos a 65°C), se hicieron dos lavados de xilol durante 5 minutos y posteriormente se rehidrataron por gradiente de alcohol (desde etanol absoluto hasta etanol al 70%, terminando con agua destilada).

### 8.6.1 *FluoroJade C.*

Después de rehidratar el tejido, se procedió a colocar las laminillas en vasos koplín con solución de Sudan Black, se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz, con el fin de reducir la autofluorescencia. A continuación, se

aplicó un lavado en cortina con isopropanol al 70%, seguido de 3 lavados con PBS 5 minutos. Se delimitó el tejido cerebral sobre la laminilla con plumón hidrofóbico y finalmente se les colocó solución de FluoroJade C al 0.0001% en ácido acético al 1% durante 20 minutos. Al término de la incubación se hicieron 3 lavados con H<sub>2</sub>O bidestilada para retirar el exceso de FluoroJade C, se dejaron secar a temperatura ambiente durante una noche, protegidas de la luz y posteriormente se aclararon con xilol para ser montadas con Eco-mount y ser visualizadas al microscopio.

#### *8.6.2 Gliosis reactiva.*

Una vez rehidratados los cortes en parafina, se procedió a realizar la recuperación de antígenos con buffer de citratos. Se incubaron las laminillas en solución de Sudan Black, durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para reducir la autofluorescencia. A continuación, se aplicó un lavado en cortina con isopropanol al 70% seguido de 3 lavados con PBS 5 minutos. Se delimitó el tejido cerebral sobre el portaobjetos con plumón hidrofóbico y se continuó con el bloqueo con PBS/albúmina al 1% durante 1:30 h, posteriormente se incubaron los anticuerpos primarios en PBS/albúmina 1% (GFAP 1:100, Iba-1 1:1000) a 4°C durante la noche. Se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos cada uno y se incubaron los anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos (Alexa 488 y Alexa 594) a una dilución de 1:500, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavaron las laminillas 3 veces con PBS y se montaron con medio de montaje con DAPI (para contratinción de núcleos).

## 8.7 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como la media  $\pm$  error medio estándar (SEM). Se utilizó el software Prisma versión 7.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) para el análisis estadístico. Para los gráficos de albúmina y transtiretina se usó una  $n=10$  y se realizó una  $t$  de student comparando ambos tipos de dieta (AL vs RA). Los gráficos del mRNA y cantidad de citocinas ( $n=6$ ) se analizaron con un ANOVA de 2 vías, con una prueba posterior de Tukey. Se consideró significativo un valor de  $p<0.05$ .

En el caso específico que corresponde a las inmunofluorescencias, se obtuvieron imágenes digitalizadas con un microscopio de fluorescencia y software de Leica de las regiones CA1, CA3, hilus y giro dentado (GD), a un objetivo 40x (360.18 x 260.38  $\mu\text{m}$ ). Posteriormente las imágenes se analizaron con el software Fiji-ImageJ. Para determinar la densidad de pixeles integrados (IntDen), como medida de intensidad de señal de las células positivas al marcaje con cada anticuerpo, de la siguiente forma:

1. La imagen obtenida con el filtro correspondiente a cada señal se almacenó en formato tiff, todas con el mismo valor de exposición, ganancia, brillo y contraste, para no agregar variaciones en la intensidad del marcaje.
2. Se calibró la escala de cada imagen para que todas tuvieran la misma área de cuantificación.
3. Una vez que fue escalada la imagen, ésta se convirtió a un formato escala de grises sin modificar el brillo, contraste o gamma.

4. Se duplicó la imagen a un formato binario y se fijó un umbral estándar, para obtener un contorno de cuantificación homogéneo.
5. Se ejecutó la opción análisis de partículas, para obtener la densidad integrada de píxeles en aquellos contornos  $>10 \mu\text{m}^2$ .
6. Una vez obtenido el promedio de la IntDen se multiplicó por el área total con marca positiva. Se graficó en Prisma y se hizo análisis estadístico con ANOVA de una vía. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ .

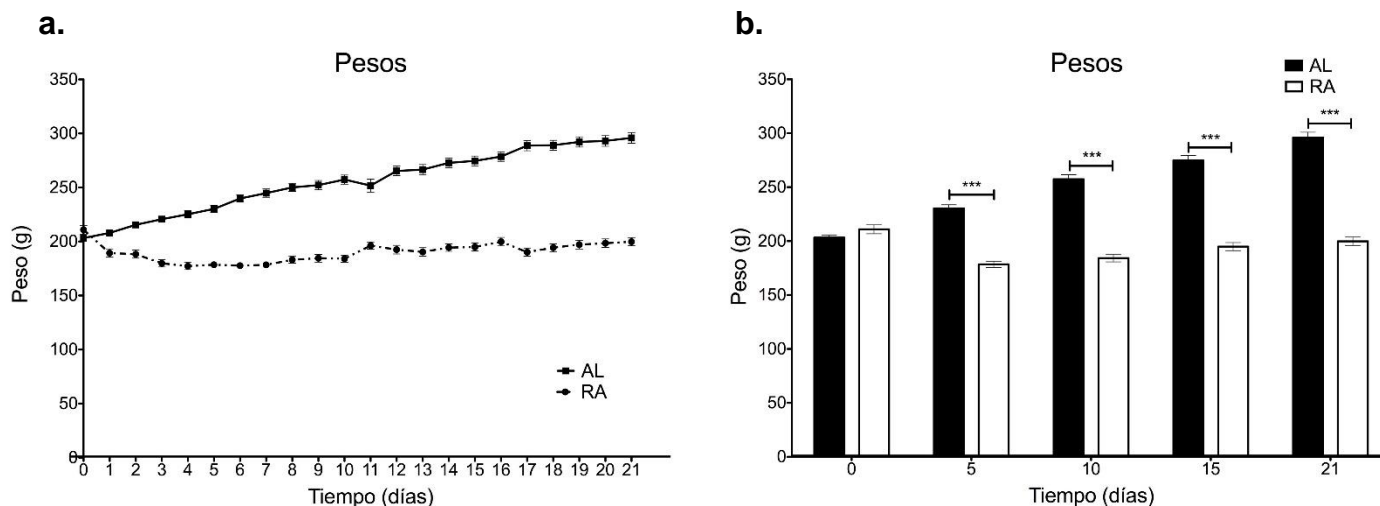
## **9. Resultados.**

### 9.1 Evaluación nutricional.

El primer objetivo de este proyecto fue evaluar si la restricción alimentaria *per se* provocaba una alteración en el estado de nutrición. Esto debido a la poca información que existe respecto a la parte nutricional del modelo, además que existe controversia acerca del uso de terapias metabólicas como tratamiento alternativo para la epilepsia (por los efectos adversos que pueden producir). Para corroborar los hallazgos previamente informados por nuestro laboratorio y otros grupos de trabajo, utilizando el mismo modelo de restricción alimentaria (Arellanes-Licea et al., 2014; Landgrave et al., 2016), se hizo una comparación del peso corporal, durante el tiempo que duró el régimen alimentario, entre los grupos AL y RA.

Se observó que los animales con RA tienen una reducción de peso a partir del segundo día y posterior al quinto día comienzan a recuperarlo (Figura 1a), lo cual

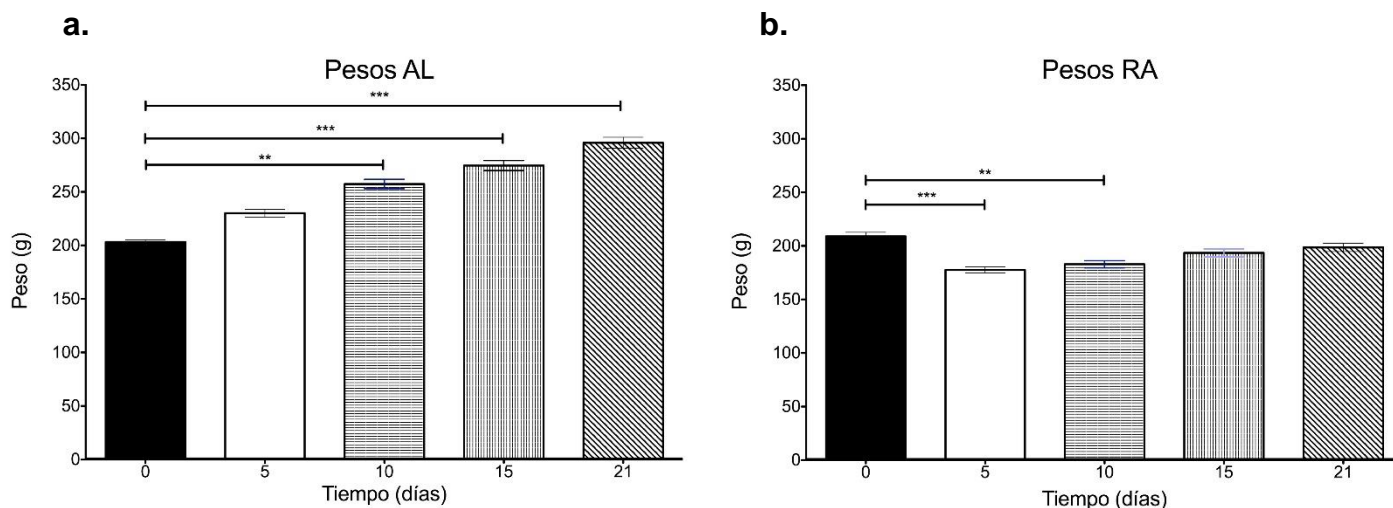
corresponde a un periodo de adaptación al nuevo horario de alimentación. En cambio, el grupo alimentado AL tiende a aumentar su peso corporal de forma lineal a través del tiempo, presentando diferencias significativas con respecto al grupo RA desde el segundo día (Figura 1b). En la Figura 2a, se puede observar de manera más clara el comportamiento de la ganancia de peso lineal en el grupo AL conforme transcurre el tiempo. En la Figura 2b se destaca que el grupo RA muestra diferencias significativas en el peso hasta el décimo día comparándolo con su peso inicial.



**Figura 1.** Representación gráfica de la variación de peso durante el transcurso del régimen alimentario (a) *ad libitum* (AL) vs (b) restricción alimentaria (RA) y su comparación en diferentes tiempos del tratamiento. Se realizó una *t* de student. \*\*\* ( $p \geq 0.0001$ ),  $n=20$ .

Por otra parte, evaluar el estado de nutrición de un organismo es un proceso complejo, que requiere del apoyo de distintos componentes bioquímicos adicionales para tener una mejor aproximación. A pesar de que ya se han descrito los efectos metabólicos que produce la restricción alimentaria (Arellanes-Licea et al., 2014; Rivera-Zavala et al., 2017; Perez-Mendoza et al., 2014; Langrave-Gomez et al., 2016), aún queda abierta la posibilidad de que ésta dieta restrictiva pueda producir

un grado de desnutrición, ya que no se habían evaluado marcadores de nutrición en este modelo. Por lo tanto, se cuantificaron dos proteínas plasmáticas (albúmina y transtiretina) que son utilizadas como marcadores de desnutrición en humanos (Dellière & Cynober, 2016) para observar los cambios que pudieran estar ocurriendo al finalizar el periodo de restricción alimentaria.

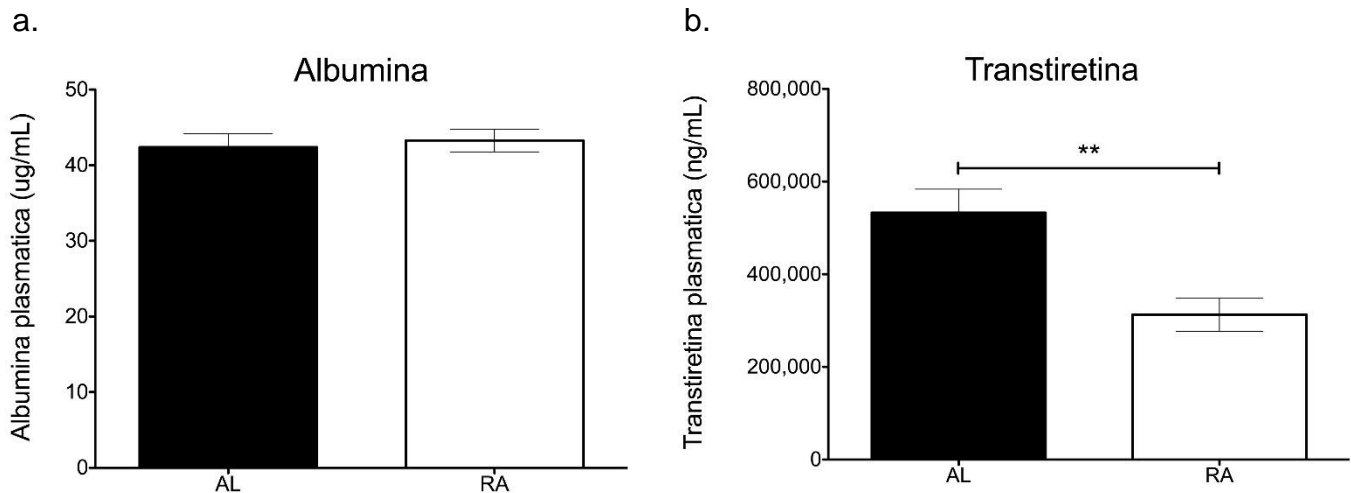


**Figura 2.** Comparación entre la ganancia (AL, a) y el mantenimiento (RA, b) del peso corporal en los distintos regímenes alimentarios. Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Fueron considerados significativos los valores de  $p \leq 0.05$ . \*\* ( $p \leq 0.001$ ), \*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ),  $n=20$ .

La albúmina es una proteína con una vida media de 14 a 20 días. Dentro de sus funciones se encuentra el transporte de algunos minerales, hormonas y ácidos grasos, además de ayudar a mantener la presión oncótica capilar. Actualmente, se considera una herramienta diagnóstica adicional, junto con otros marcadores bioquímicos para evaluar desnutrición (Bharadwaj et al., 2016). De acuerdo a lo anterior, se puede observar que la albúmina (Figura 3a), no presenta diferencias significativas al comparar los grupos con ambos regímenes alimentarios, lo cual nos



podría estar indicando que no hay una malnutrición crónica (Dellière & Cynober, 2016), al menos hasta los 21 días que dura la dieta restrictiva.



**Figura 3.** Representación gráfica de la cuantificación de las proteínas plasmáticas relacionadas con la nutrición en los diferentes grupos. Como se observa en la figura, no hay cambios significativos en la concentración de albúmina (a) en plasma de los animales AL y aquellos sujetos con la dieta restrictiva, sin embargo, la transtiretina (b) se encuentra reducida significativamente, la cual podría estar afectada por factores ajenos al estado de nutrición. Se utilizó una *t* de student. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \*\* ( $p \leq 0.001$ ),  $n=20$ .

Por otro lado, para determinar un cambio más agudo, en cuanto al estado de nutrición, se utiliza actualmente como marcador la transtiretina. Ésta es una proteína de transporte para el retinol y la hormona tiroidea T4, enriquecida en triptófano y que es principalmente sintetizada por el hígado, con una vida media de 1.9 días (Dellière & Cynober, 2016). De manera interesante, se observa una disminución significativa en el grupo RA respecto al grupo AL (Figura 3b). Los niveles de transtiretina se pueden modificar bajo ciertas circunstancias como la última ingesta de alimento previa al análisis y el estado de hidratación, así como procesos de falla renal o hepática (Dellière & Cynober, 2016; Bharadwaj et al., 2016); por lo cual se

decidió realizar también biometrías hemáticas, como prueba complementaria y así eliminar la posibilidad de un proceso anémico subyacente.

En la Tabla 2 se puede observar la comparación de los parámetros hematológicos en ambos grupos (AL y RA; n=6), sin destacar ninguna diferencia significativa, y encontrándolos dentro de los parámetros normales reportados en esta especie y a esa edad (Weiss et al., 2010). Con estos resultados se sugiere que la restricción alimentaria no produce un efecto nocivo sobre la nutrición del individuo, abriendo la posibilidad de su posible uso bajo vigilancia individualizada y suplementación de nutrientes necesarios.

<b>Parámetros hematológicos</b>			
	<b>AL</b>	<b>RA</b>	<b>p</b>
<b>Hemoglobina (g/L)</b>	149.167 ± 2.088	156.5 ± 1.910	0.0355
<b>Hematocrito (L/L)</b>	0.463 ± 0.008	0.48 ± 0.006	0.3125
<b>Volumen Globular Medio (fL)</b>	60.333 ± 1.085	56.333 ± 1.333	0.0625
<b>Concentración de hemoglobina globular media (g/L)</b>	328 ± 5.922	359.333 ± 33.027	1.0000
<b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	6.333 ± 0.418	5.367 ± 0.601	0.2188
<b>Neutrófilos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	1.35 ± 0.076	1.617 ± 0.392	0.7500
<b>Linfocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	4.8 ± 0.381	3.6 ± 0.454	0.0938
<b>Plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	670.667 ± 21.233	714.333 ± 50.740	1.0000
<b>Fibrinógeno (x10<sup>9</sup>/L)</b>	4.667 ± 0.422	3.333 ± 0.422	0.1515

**Tabla 2.** Se muestran los valores del grupo alimentado con restricción alimentaria (RA, n=10), no encontrando diferencias significativas contra el grupo *ad libitum* (AL, n=10), p> 0.05. Los datos son presentados como la media ± SEM.

## 9.2 Marcadores de neuroinflamación.

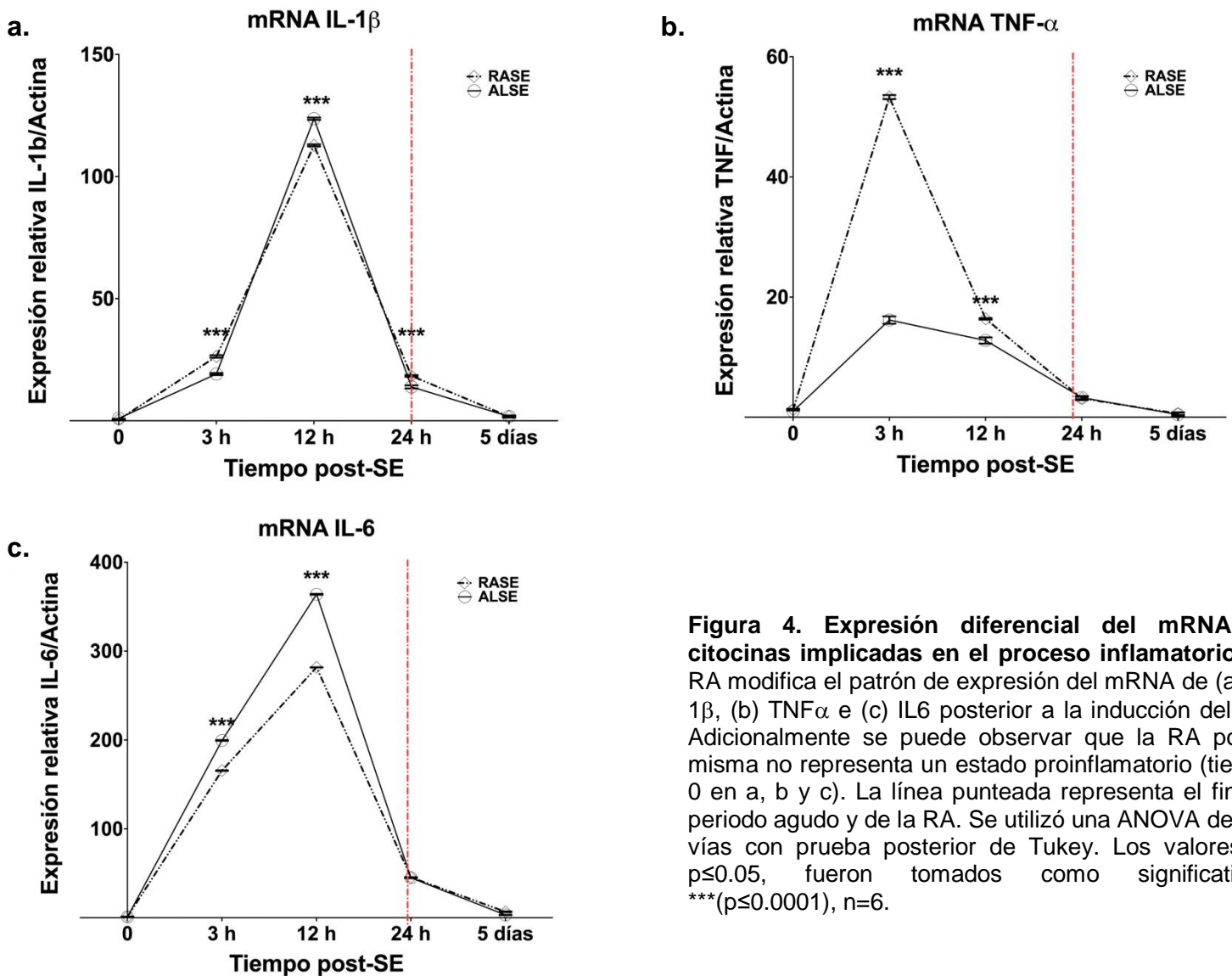
### 9.2.1 Expresión de genes mediante qRT-PCR.

Para cumplir el segundo objetivo del proyecto, se cuantificó el mRNA de las principales citocinas proinflamatorias en hipocampo. En la Figura 4a se observa el patrón de expresión de la IL-1 $\beta$  durante el SE y cómo es modificado cuando se aplica la restricción alimentaria. El punto 0 corresponde a la expresión basal en ambos grupos AL y RA después de 21 días bajo los dos regímenes alimentarios previo a la inducción del SE, con lo cual se demostró que no existe un aumento del transcrito de esta citocina con respecto al control. De igual manera, se observa en la Figura 4a que la expresión relativa de IL-1 $\beta$  es mayor en los animales con RA a las 3 h post-SE comparado con el control AL. Sin embargo, el pico de expresión en ambos grupos se observa a las 12 h posteriores a la inducción del SE, como ya se ha descrito (Eriksson et al., 2000), teniendo una diferencia significativamente menor en el grupo tratado con RA respecto del grupo AL. Adicionalmente, a las 24 h la diferencia entre la expresión de IL-1 $\beta$  es mayor en el grupo RASE. Y finalmente, a los 5 días post-SE en ambos grupos la expresión de IL-1 $\beta$  se encuentra en niveles basales.

De igual manera la expresión de TNF- $\alpha$  se modifica por la restricción alimentaria y en ambos grupos, el pico de expresión se puede apreciar a partir de las 3 horas post-SE y posteriormente disminuye a través del curso temporal (Figura 4b). La diferencia que se presenta es significativa (3 y 12 h post-SE), demostrando un

aumento en el grupo con RA comparado con el grupo AL. Cabe destacar que el pico de esta citocina antecede al de IL-1 $\beta$ , y de la misma forma la expresión se reduce a las 24 h hasta encontrarse en su nivel basal en el día 5 (figura 4b).

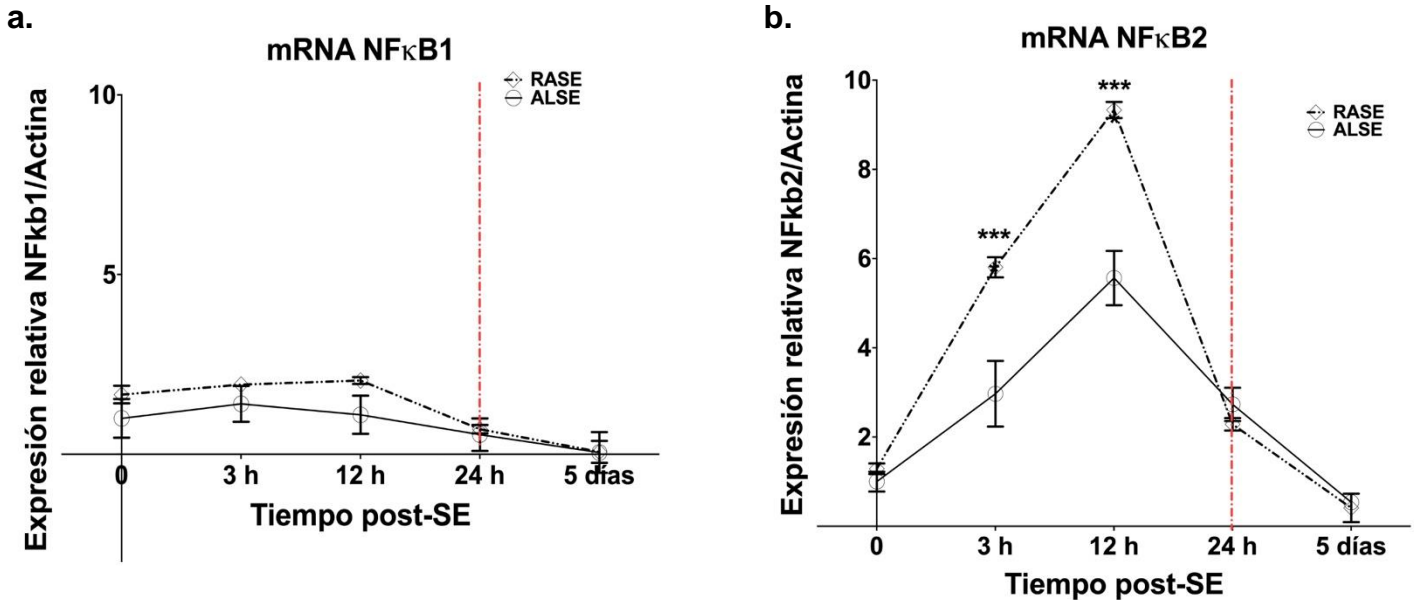
En cuanto a la expresión de IL-6 el aumento es gradual hasta las 12 h en donde se aprecia el pico de expresión en ambos grupos, como ha sido descrito en otros trabajos (Rosell et al., 2003). Sin embargo, la cantidad de transcrito en el grupo RASE, se mantiene significativamente reducida del grupo ALSE. De igual forma que los dos casos anteriores, la expresión de dicha interleucina se reduce a las 24 horas y a los 5 días se observan niveles basales sin evidenciar alguna diferencia estadística en estos últimos dos tiempos (Figura 4c).



**Figura 4. Expresión diferencial del mRNA de citocinas implicadas en el proceso inflamatorio.** La RA modifica el patrón de expresión del mRNA de (a) IL-1 $\beta$ , (b) TNF $\alpha$  e (c) IL6 posterior a la inducción del SE. Adicionalmente se puede observar que la RA por sí misma no representa un estado proinflamatorio (tiempo 0 en a, b y c). La línea punteada representa el fin del periodo agudo y de la RA. Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , fueron tomados como significativos. \*\*\*( $p \leq 0.0001$ ),  $n=6$ .

Sumado a los hallazgos anteriores, se cuantificó la expresión relativa de p-50 y p-52 (NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2 respectivamente) un complejo proteico que forma parte del factor de transcripción NF $\kappa$ B (Figura 5), un factor fundamental en el proceso inflamatorio, involucrado en la activación de la transcripción de múltiples genes, en respuesta a diferentes estímulos como citocinas proinflamatorias. De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar por un lado que NF $\kappa$ B1 (Figura 5a)

incrementa con la RA y en los grupos RASE, sin ser significativo contra ALSE. De igual manera, NFκB2 (Figura 5b) aumenta su transcripción y este caso si es significativo en el grupo RASE vs ALSE.



**Figura 5. Expresión de mRNA de NFκB1 y NFκB2 en animales AL y sujetos a RA posterior al SE.** Como se aprecia en ambas gráficas, el transcrito en ambos genes (a y b) se ve incrementado en el grupo RASE, y solamente en el caso de NFκB2 (b) son significativas estas diferencias, con un pico de expresión a las 12 horas post-SE. La línea punteada representa el fin del periodo agudo y de la RA. Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , fueron tomados como significativos. \*\*\*( $p \leq 0.0001$ ),  $n=6$ .

Adicionalmente, se cuantificó la expresión de algunas quimiocinas relacionadas con procesos inflamatorios, entre las que se encuentran CX3CL1, CXCL1 y CXCL10. CX3CL1 es una quimiocina presente en las neuronas, que interactúa directamente con la microglía para modular su activación durante procesos tanto homeostáticos como patológicos (epilépticos e inflamatorios) (Yeo et al., 2011; Eyo et al., 2016). En la figura 6a se puede apreciar como la RA, *per se*, produce un aumento en la tasa de transcripción de este gen y aunque no es significativo ( $p=0.1392$ ), la presencia de esta quimiocina en la RA, indica que durante el periodo en que se

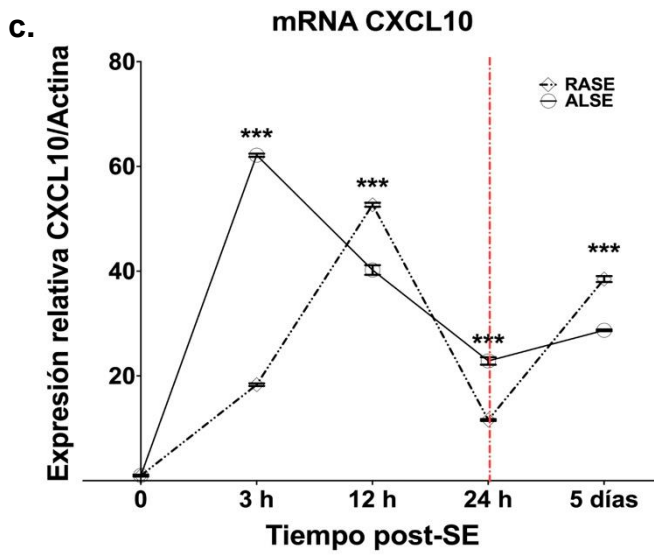
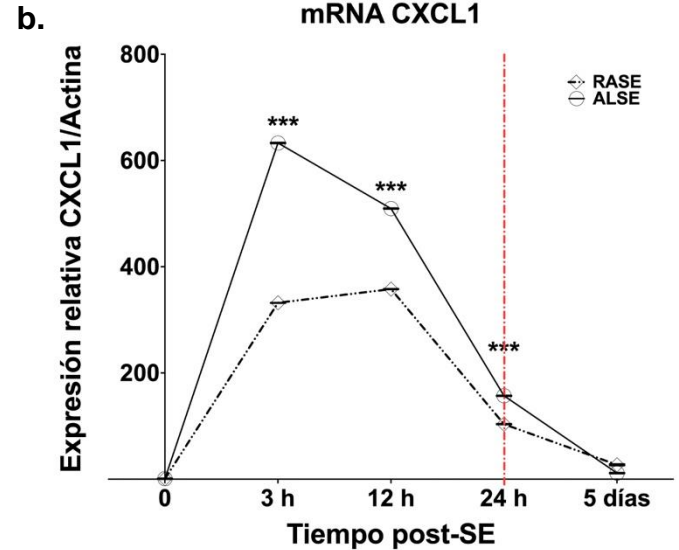
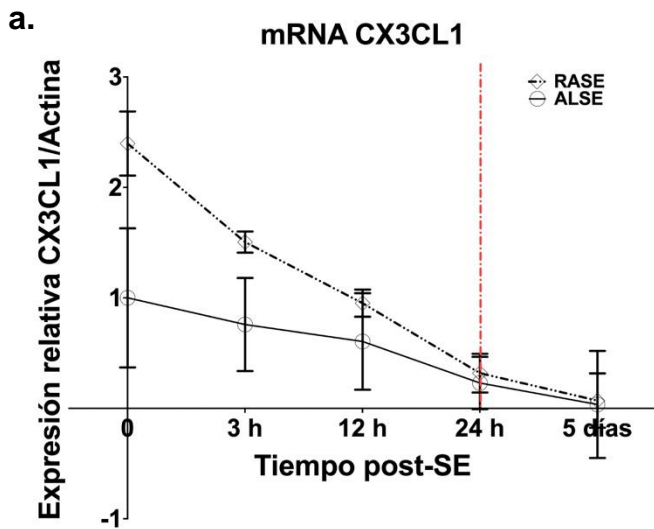
aplica este régimen alimentario se conserva una adecuada interacción entre neuronas y microglía, es decir, no hay inflamación. En cuanto a la expresión de esta quimiocina posterior a la inducción del SE, se observa cómo se conserva el incremento en los animales con RA, en comparación con el grupo *ad libitum*, sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en ninguno de los tiempos. De manera interesante, se puede observar que a mayor tiempo post-SE tiende a decrecer la cantidad de CX3CL1, sin embargo, los grupos RASE mantienen una mayor cantidad de transcrito para este gen.

Por otro lado, en la figura 6b, se observa la cantidad de transcrito para CXCL1, una quimiocina involucrada en el reclutamiento de células inflamatorias periféricas, principalmente macrófagos y monocitos (Johnson et al., 2011), considerándose una quimiocina proinflamatoria. Como se observa en la Figura 6b, el pico de expresión en los animales del grupo ALSE ocurre a las 3 horas y posteriormente disminuye, a diferencia del grupo RASE que tiene un comportamiento diferente, presentando un pico a las 12 horas. No obstante, el grupo RASE mantiene niveles significativamente bajos de mRNA de esta quimiocina a las 3, 12 y 24 horas posteriores a la inducción del SE, en comparación con el grupo ALSE.

Adicionalmente, las células endoteliales del sistema vascular del SNC, neuronas y células gliales expresan CXCL10 en estados inflamatorios, promoviendo el reclutamiento del sistema fagocítico periférico hacia los sitios de lesión, de modo que es considerada una quimiocina proinflamatoria (Brambilla et al., 2005; Niu et al., 2019). De esta forma en la Figura 6c, se puede observar que la expresión de

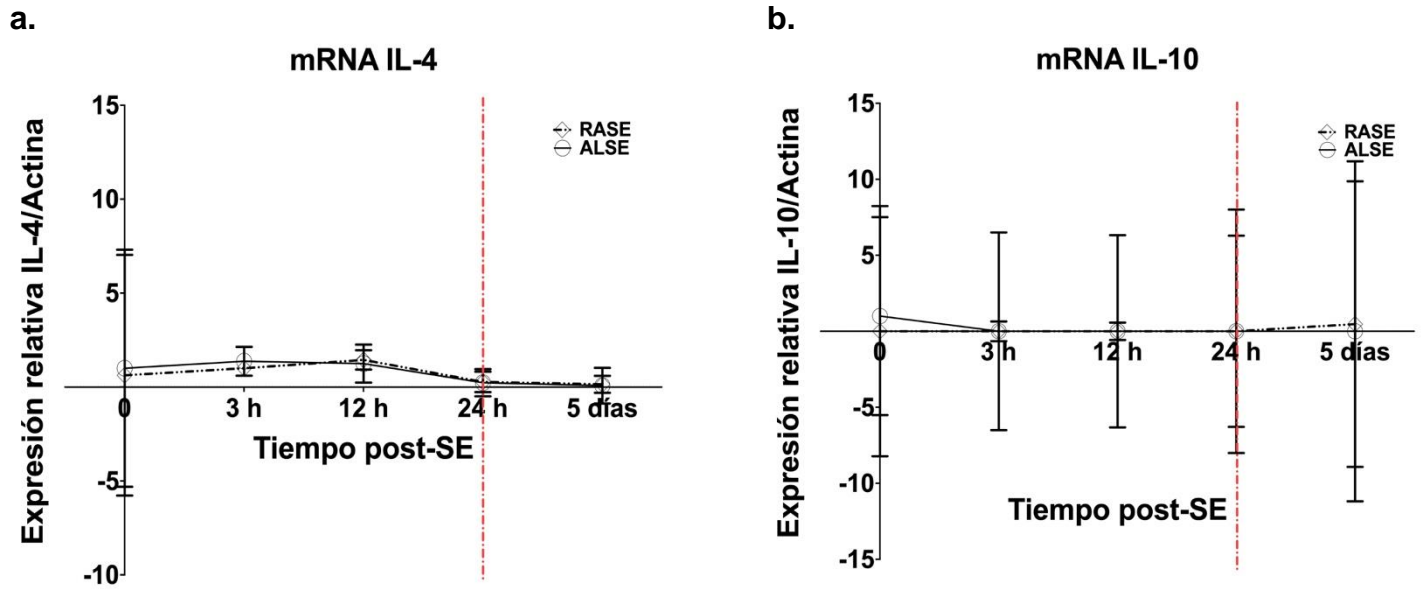
CXCL10 tiene un patrón similar en ALSE y RASE, pero desplazado en tiempo. En este sentido, tenemos que en el grupo ALSE su mayor expresión ocurre a las 3 horas, la cual es significativamente mayor con respecto al grupo RASE en el mismo tiempo. A las 12 horas se puede observar que ocurre el mayor aumento en la expresión de CXCL10 en el grupo RASE, teniendo una diferencia significativa contra el grupo ALSE en el mismo tiempo. Sin embargo, cabe destacar que este aumento no llega al mismo nivel que el pico del grupo ALSE 3 h y esta diferencia también es significativa. Posteriormente, disminuye la expresión a las 24 h post-SE en ambos grupos. Cinco días después de la inducción del SE se puede observar que hay un incremento significativo de CXCL10 en el grupo con RASE, posiblemente a este tiempo este desempeñando otro papel diferente en la modulación del estado inflamatorio, debido a que ninguna de las otras citocinas muestra un aumento significativo en este tiempo.





**Figura 6. Expresión de mRNA de algunas quimiocinas implicadas en neuroinflamación.** Se puede observar que la RA por sí misma tiende a aumentar la cantidad de CX3CL1 (a) (antiinflamatoria), con respecto al grupo AL. Adicionalmente, la RA modifica el patrón de expresión del mRNA de CXCL1 (b) y CXCL10 (c) desplazando los picos de expresión hacia las 12 horas, a diferencia del grupo AL en donde ocurre a las 3 horas post-SE. La línea punteada representa el fin del periodo agudo y de la RA. Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , fueron tomados como significativos. \*\*\*( $p \leq 0.0001$ ),  $n=6$ .

También se midió la expresión relativa de 2 citocinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL10), para evidenciar el papel de su transcripción durante este proceso. No se encontró ninguna diferencia significativa, en ninguna de las dos condiciones a través del curso temporal (Figura 7). Lo cual sugiere que la acción de la RA no es debido al incremento en la expresión en los genes de citocinas anti-inflamatorias evaluadas en este proyecto; sin embargo, existen otras citocinas anti-inflamatorias que podrían estar interactuando como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ).



**Figura 7. Expresión del mRNA de citocinas antiinflamatorias.** El transcrito del gen para IL-4 (a) tiene un breve incremento a las 12 horas, el cual no es significativo en ningún grupo. De igual manera, el transcrito para el gen de IL-10 no muestra diferencias significativas en ninguno de los grupos a través del curso temporal. La línea punteada representa el fin del periodo agudo y de la RA. Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey.  $n=6$ .

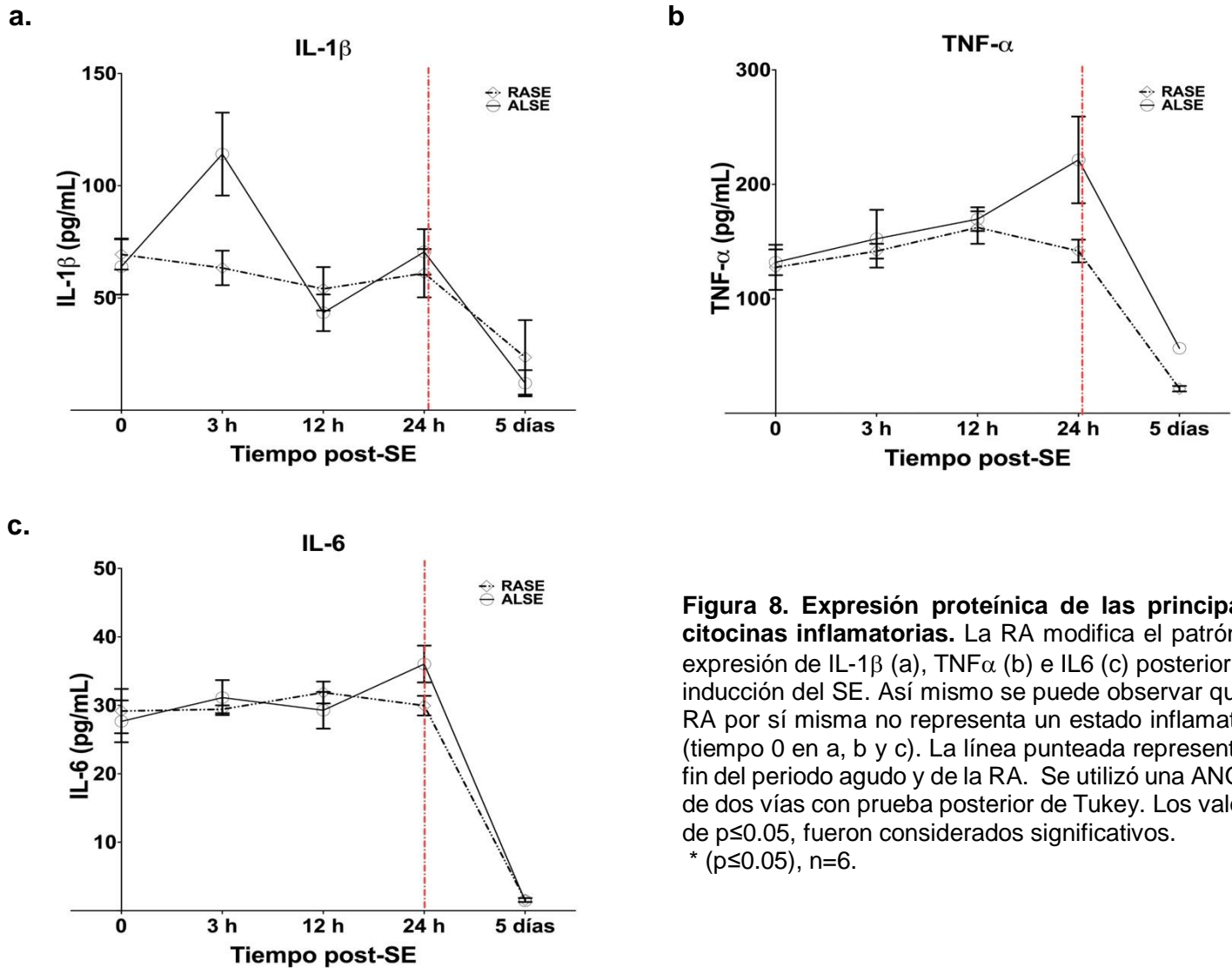
### 9.2.2 Cuantificación de citocinas proinflamatorias.

Como parte del objetivo 2, se realizó un análisis mediante ensayos de ELISA de la cantidad de proteína de las citocinas proinflamatorias en homogenados hipocampales a diferentes tiempos. En la Figura 8a, se presenta la cantidad de IL- $1\beta$  para los animales alimentados AL y RA (representados en el punto cero) y aquellos con ALSE y RASE a través del curso temporal, en donde se pueden observar diferencias significativas a las 3 h post-SE, donde el grupo ALSE exhibe un aumento significativo y una reducción en el contenido de dicha citocina en el grupo RASE. Posteriormente, el grupo ALSE presenta un descenso súbito a las 12 h post-SE para incrementar levemente a las 24 h. De manera contraria, el grupo

RASE presenta un descenso discreto a las 12 h y mantiene sus niveles hasta las 24 h por debajo del basal, sin presentar diferencias significativas con su control (RA). Cabe señalar que el grupo RASE nunca presentó un pico evidente como fue en el caso del grupo ALSE, quizá se deba a que haya ocurrido en alguno de los intervalos no evaluados en este proyecto. Al cuantificar la citocina en un tiempo más largo (5 días post-SE) se observó una disminución de IL-1 $\beta$  por debajo de los niveles basales en ambos grupos.

Para el caso de TNF- $\alpha$  (Figura 8b), el comportamiento de la cantidad de la citocina tiende progresivamente al aumento a partir de las 3 h entre ambos grupos hasta las 12 h post-SE. Posteriormente a las 24 h post-SE, se puede apreciar un aumento significativo en el grupo ALSE respecto a la cantidad que se encuentra presente en el grupo RASE, el cual desciende a sus niveles basales y se abate a los 5 días.

Finalmente, en lo que respecta a la IL-6 (Figura 8c), en el grupo ALSE existe una discreta elevación a las 3 h post-SE la cual de manera interesante tiende a disminuir a las 12 h sin tener una diferencia significativa y a continuación vuelve aumentar a las 24 h post-SE. Por el contrario, el grupo RASE presenta niveles similares a los basales a las 3 h post-SE, posteriormente tiene un aumento discreto a las 12 h post-SE y vuelve a disminuir a las 24 h post-SE y aunque la estadística no muestra significancia estadística contra el grupo ALSE, sí se puede observar una tendencia a la disminución. En ambos grupos se observa una abrupta reducción de esta citocina a los 5 días, la cual es significativa respecto a sus controles.



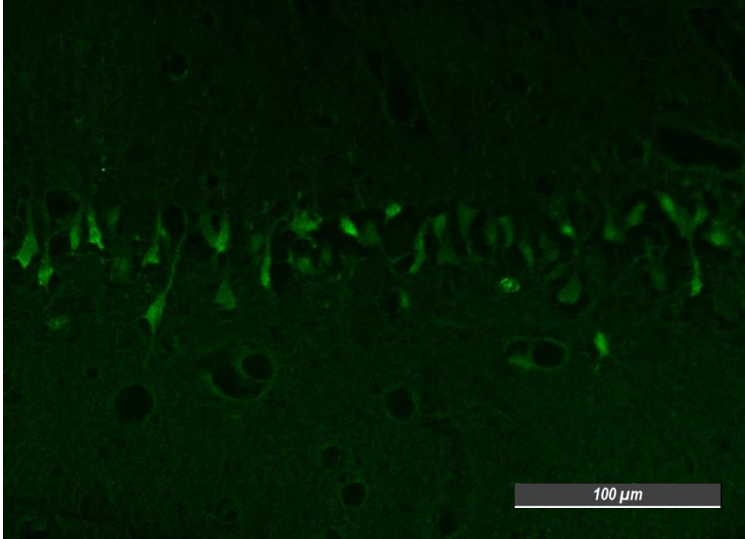
**Figura 8. Expresión proteínica de las principales citocinas inflamatorias.** La RA modifica el patrón de expresión de IL-1 $\beta$  (a), TNF $\alpha$  (b) e IL6 (c) posterior a la inducción del SE. Así mismo se puede observar que la RA por sí misma no representa un estado inflamatorio (tiempo 0 en a, b y c). La línea punteada representa el fin del periodo agudo y de la RA. Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , fueron considerados significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ),  $n=6$ .

### 9.2.3 Evaluación de muerte neuronal.

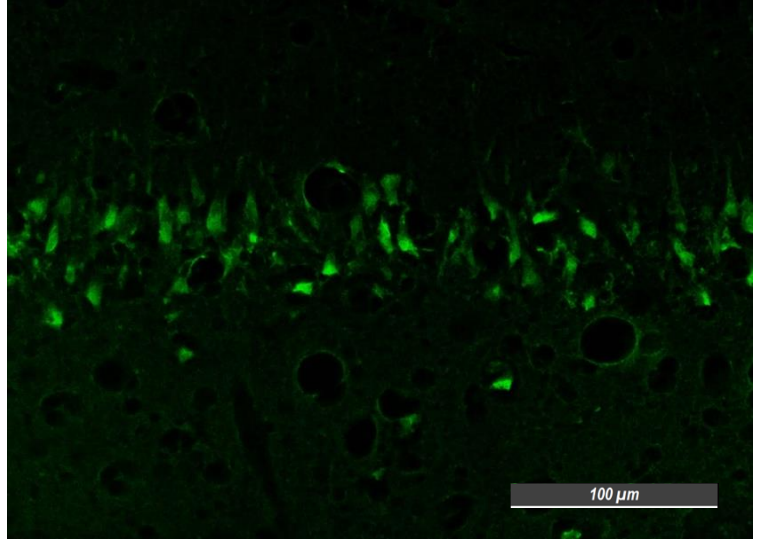
Para cumplir con el objetivo 3, primero se evaluó la muerte neuronal mediante una tinción con FluoroJade C (Figuras 9-12) en 4 regiones del hipocampo a las 24 h y 5 días post-SE. De esta forma, en la región de CA1 (Figura 9), se puede observar que a las 24 h posterior al SE existe una diferencia significativa entre los grupos ALSE (a) y RASE (b). Por otro lado, a los 5 días se puede ver que el grupo ALSE (c) tiene

casi el doble de muerte neuronal en esta región comparado con el grupo RASE (d), lo cual es corroborado con la gráfica de cuantificación de células positivas (e). Cabe destacar que en los grupos AL y RA no se observó muerte neuronal, por lo cual no se presentaron las fotomicrografías.

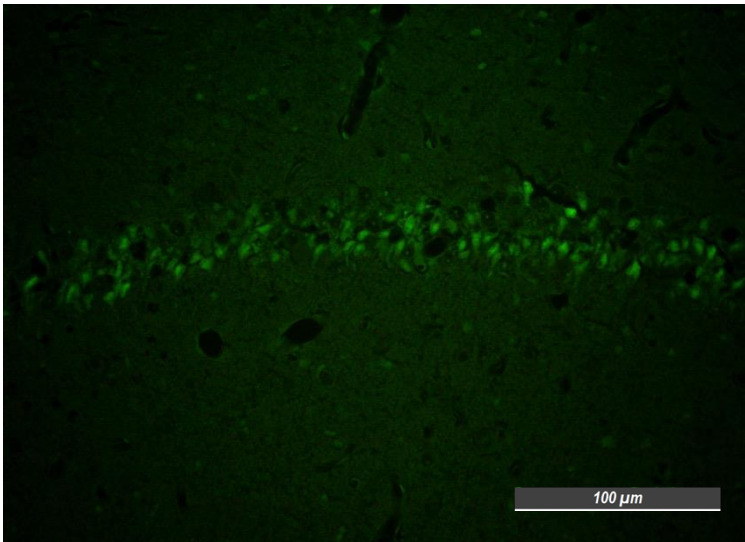
**a.**



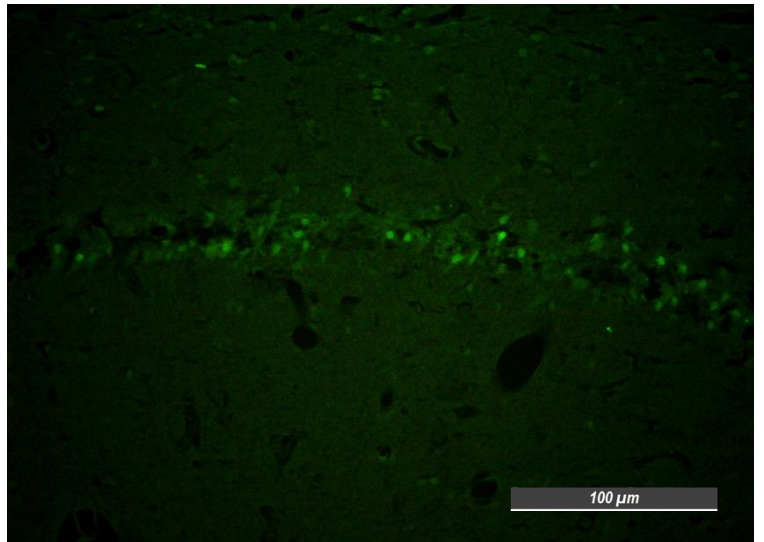
**b.**

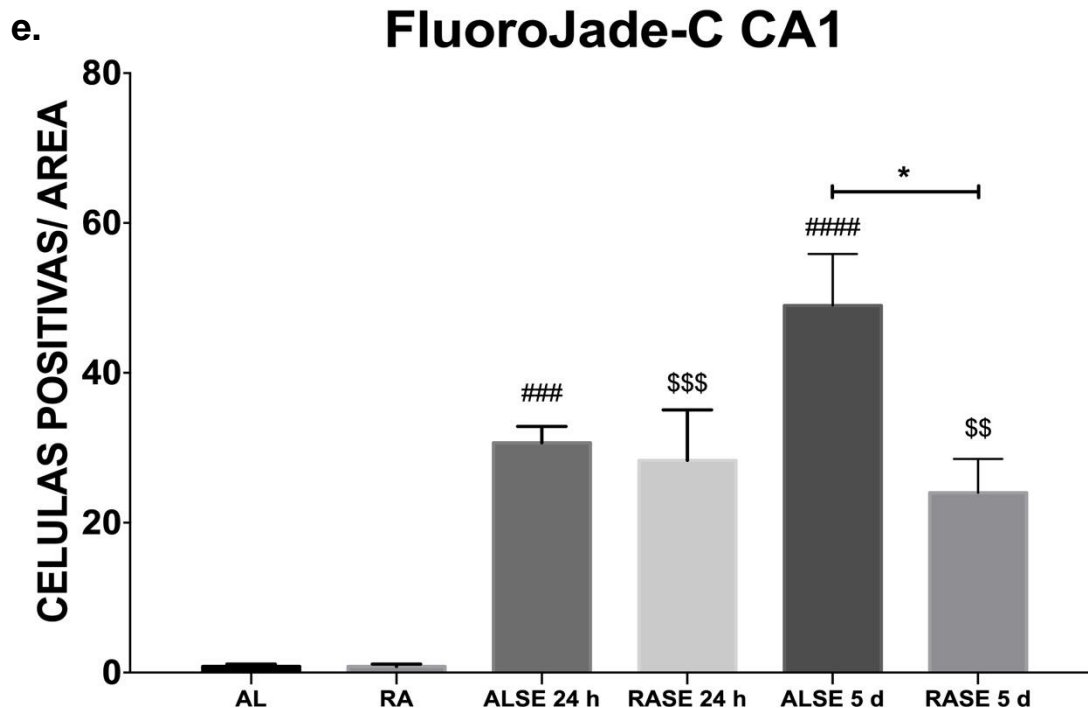


**c.**



**d.**



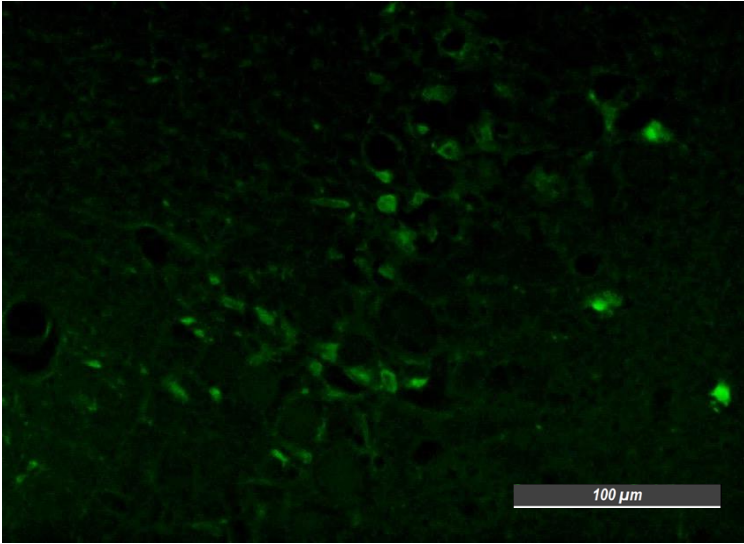


**Figura 9. Muerte neuronal en la región CA1 evaluado con tinción de FluoroJade C.** Los grupos RASE (b) y ALSE (a) 24 horas post-SE, mostraron diferencias significativas con respecto a su grupo control (AL y RA), pero no entre ambos. A diferencia de los 5 días post-SE, en donde se observa que el grupo ALSE (c) tiene casi el doble de muerte neuronal que el grupo RASE (d) en el cual reduce de manera significativa (e). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ); \$\$ ( $p \leq 0.001$ ); ###, \$\$\$ ( $p \leq 0.0001$ ); #### ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

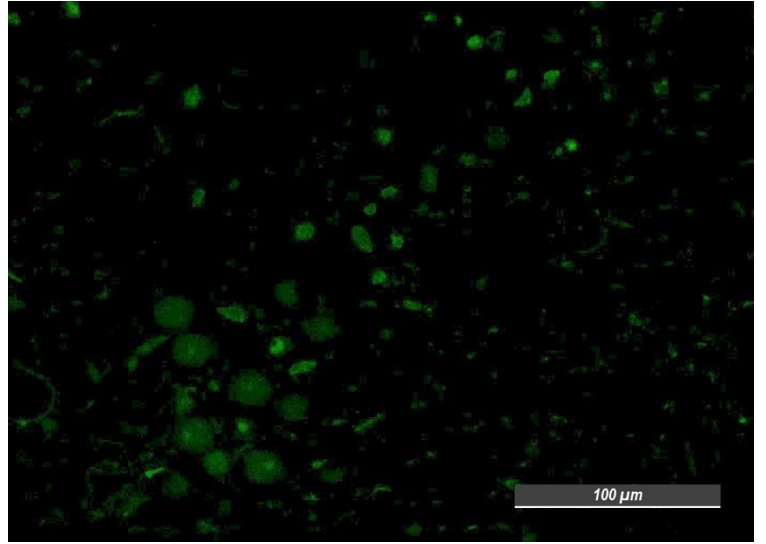
En la región de CA3 (Figura 10) aumenta la muerte neuronal a las 24 h post-SE en ambos grupos (ALSE vs RASE), con respecto a su control, pero no hay diferencias significativas entre ambos. Lo mismo ocurre a los 5 días post-SE donde la muerte neuronal se mantiene aumentada, de manera similar a lo observado en las 24 h (Figura 9).



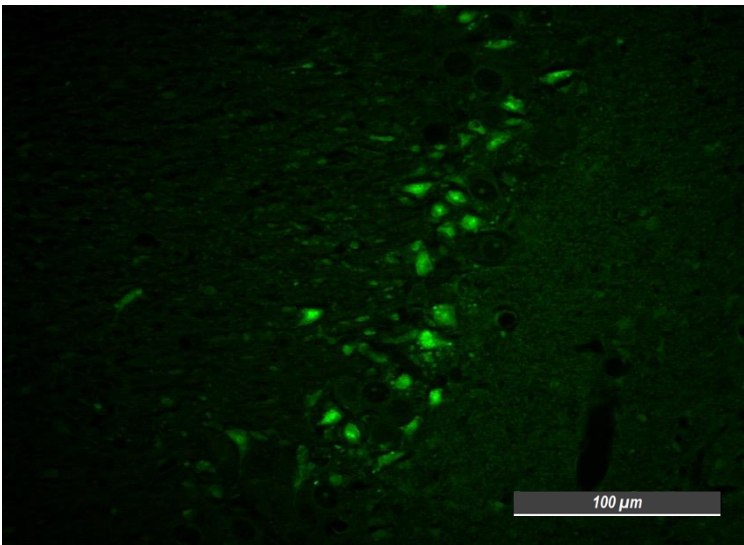
**a.**



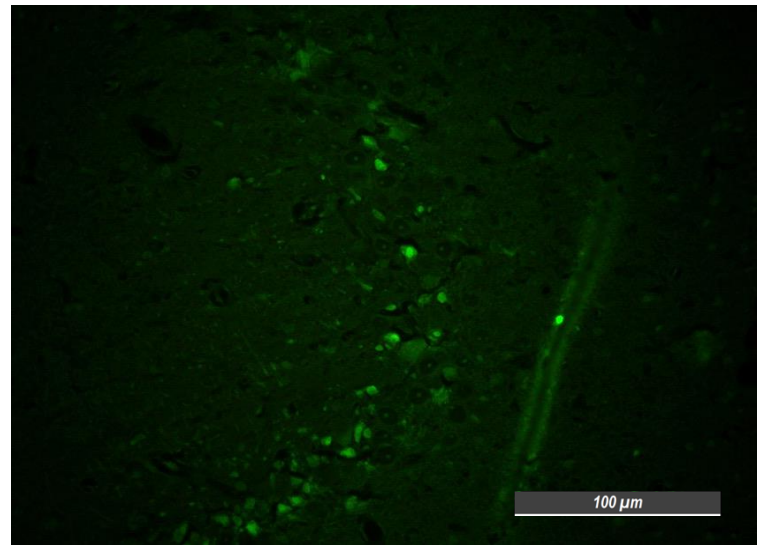
**b.**



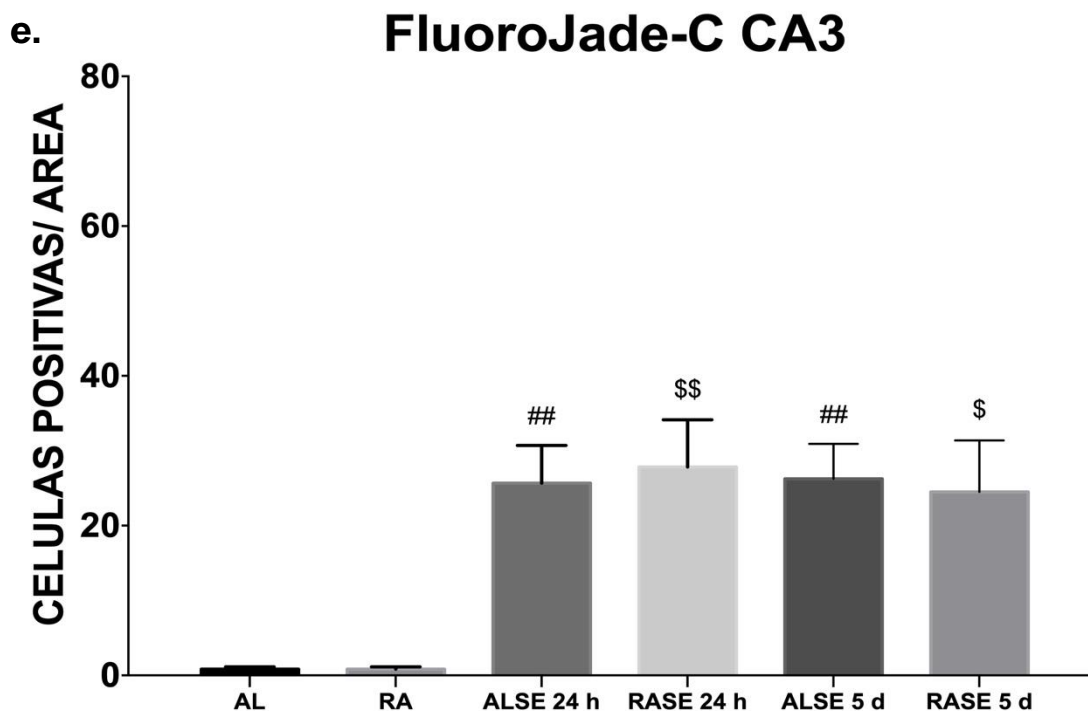
**c.**



**d.**



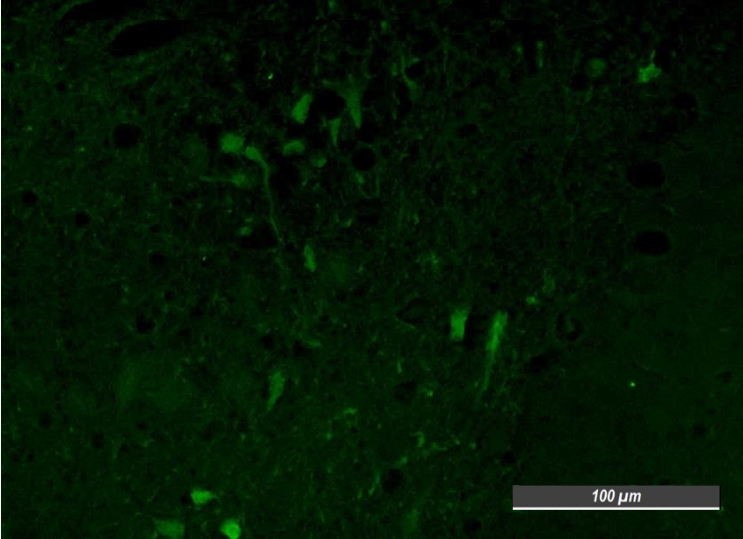




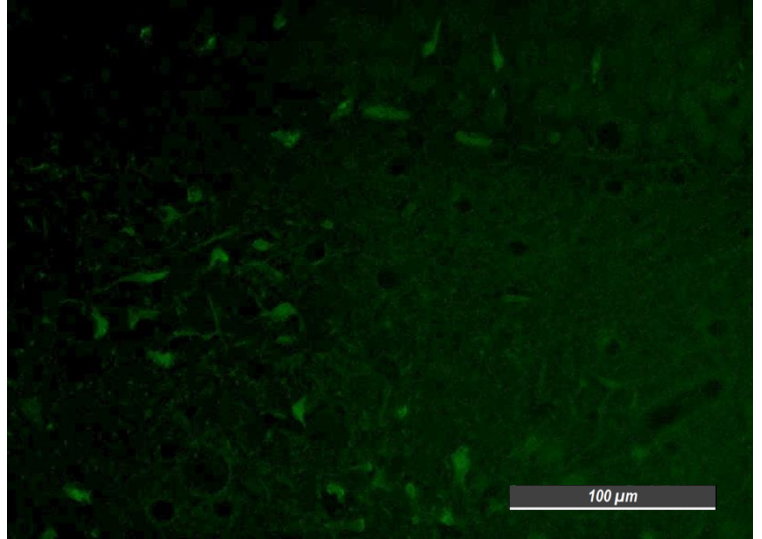
**Figura 10. Tinción con FluoroJade C en la región CA3 del hipocampo.** En esta región se puede observar que a las 24 h hay un aumento en la muerte neuronal en los grupos ALSE (a) y RASE (b), respecto a su control, la cual se mantiene en los mismos niveles hasta los 5 días, sin observar diferencias significativas entre ambos grupos posterior a la inducción del SE. Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \$ ( $p \leq 0.05$ ); ##, \$\$ ( $p \leq 0.001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

En el caso de la región del hilus (Figura 11), se observa aumento en la muerte neuronal en ambos grupos (ALSE vs RASE) 24 h posterior a la inducción del SE (Figura 11 a y b), con respecto a su control. Además, el grupo ALSE (a) tiene un ligero aumento contra RASE (b), aunque esta diferencia no es significativa. Por otra parte, existe un incremento sustancial en la cantidad de neuronas positivas a los 5 días en el grupo ALSE (c), la cual disminuye en el grupo RASE (d), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (e).

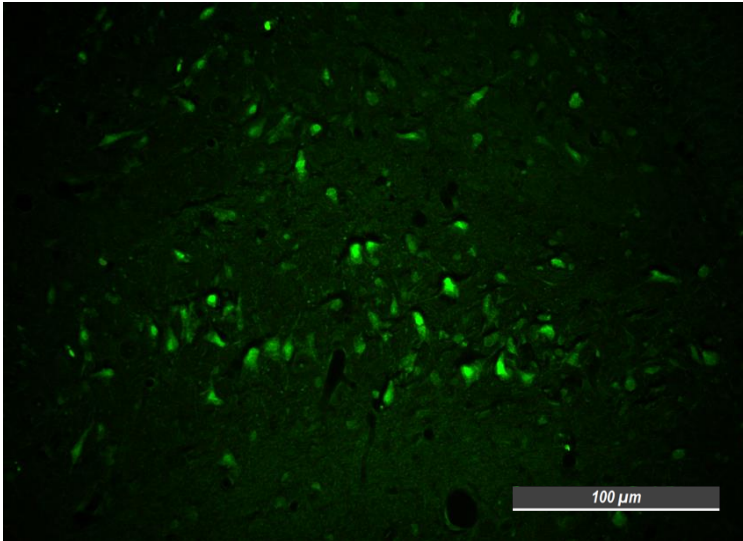
**a.**



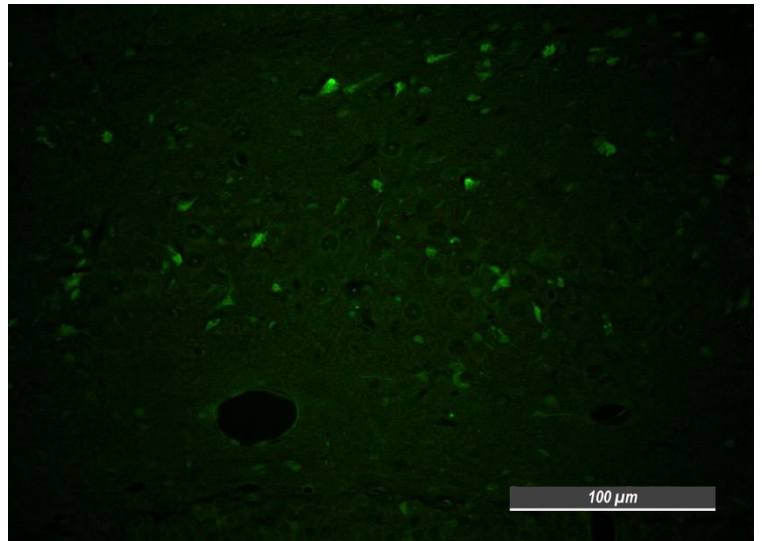
**b.**

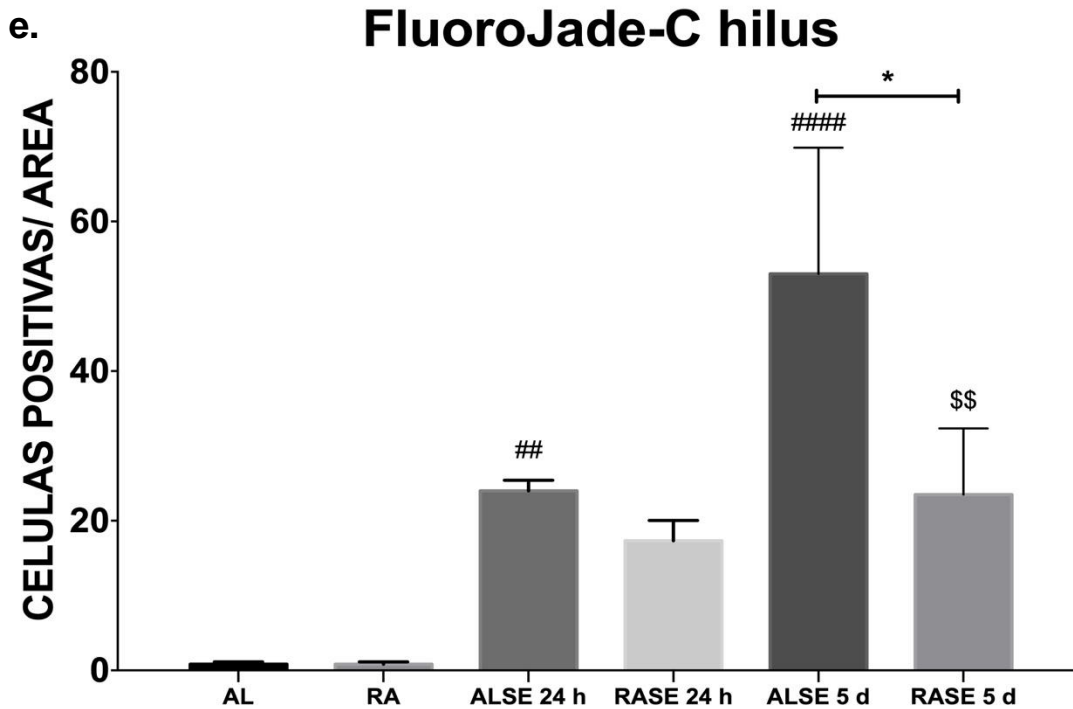


**c.**



**d.**



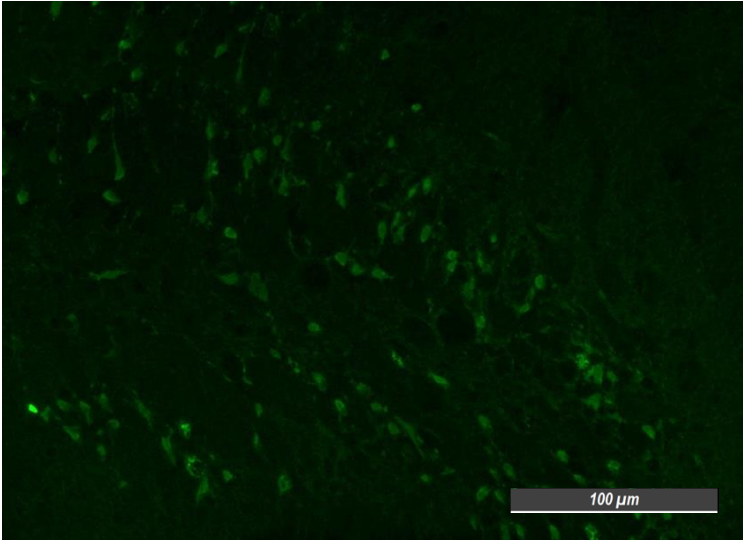


**Figura 11. FluoroJade C región del hilus.** Los grupos ALSE (a) y RASE (b) 24 h muestran un aumento en muerte neuronal respecto al control, y a pesar que no es significativa la diferencia entre ambos puede observarse que el grupo RASE tiene menor marcaje positivo. De la misma forma el grupo RASE (d) a los 5 días post-SE muestra una reducción significativa (e) en muerte neuronal respecto al grupo ALSE (c), con lo cual se sugiere el efecto protector de la RA en esta región. Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ), ##, \$\$ ( $p \leq 0.001$ ), #### ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

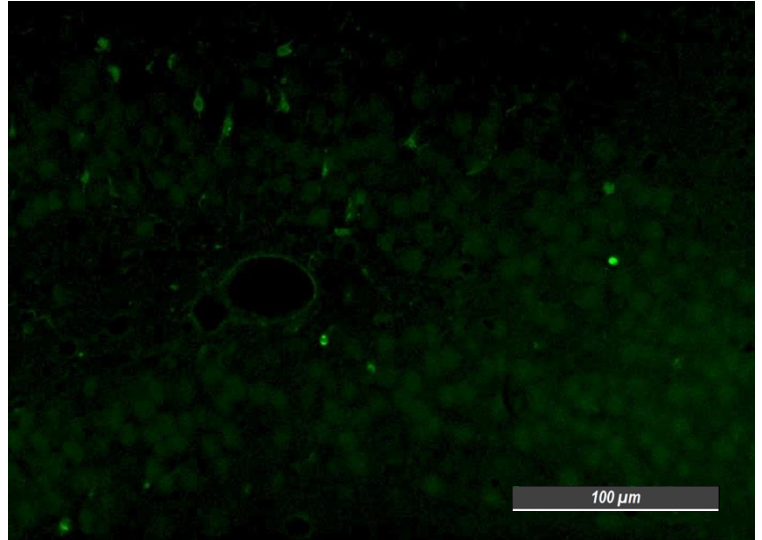
Finalmente, en la región del GD (Figura 12) el marcaje positivo para neuronas dañadas se observa en mayor cantidad en el grupo ALSE 24 h post-SE comparado contra el grupo AL. Por otro lado, el grupo RASE 24 h post-SE, aunque de igual manera muestra marca positiva contra FluoroJade C, no es estadísticamente significativa contra el grupo RA, sin embargo, si es menor que el grupo ALSE 24 h post-SE. Adicionalmente, a los 5 días disminuye la cantidad de células positivas en ambos grupos. Sin embargo, se aprecia una tendencia de aumento en el grupo

ALSE (c). De manera global, se puede observar que la RA confiere cierto efecto protector contra la muerte neuronal inducida por SE con este modelo de crisis agudas.

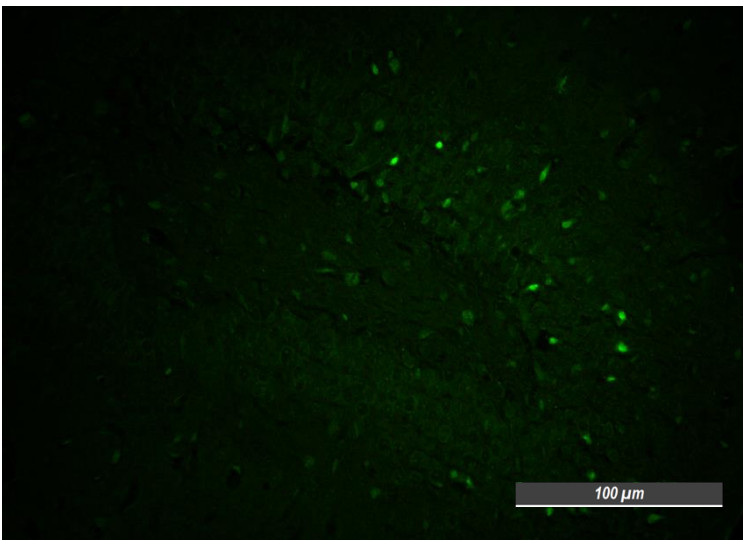
**a.**



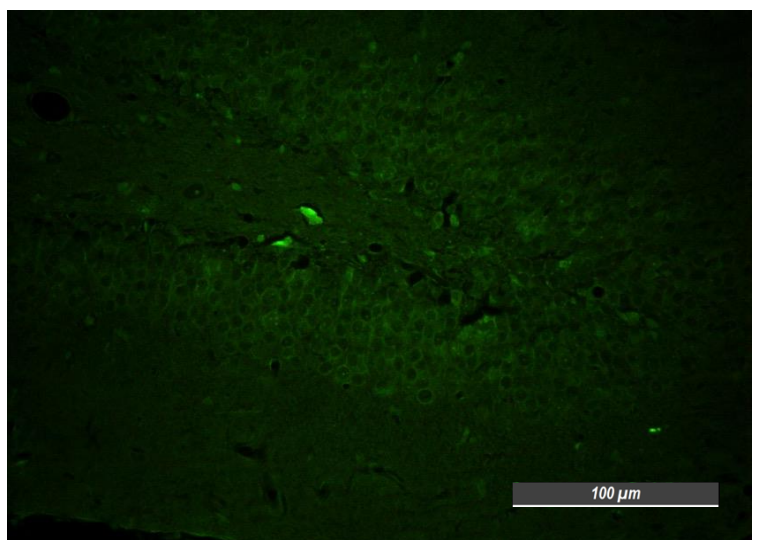
**b.**

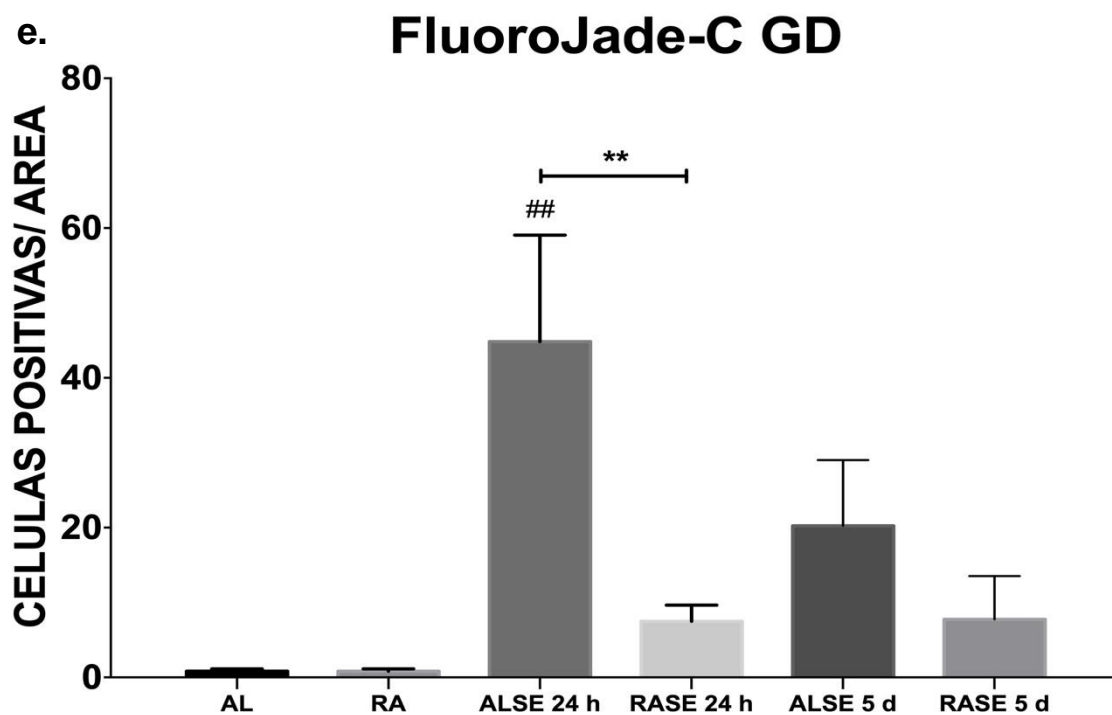


**c.**



**d.**





**Figura 12. FluoroJade C región del GD.** Asimismo, se puede apreciar un incremento en la cantidad de neuronas positivas tras la inducción del SE a las 24 h en ambos grupos (a y b), sin embargo, el grupo RASE (b) tiene una reducción significativamente (e) marcada contra el grupo ALSE (a). A pesar de que a los 5 días reduce la marca en ambos grupos, el grupo ALSE (c) tiende a tener una mayor marca respecto al grupos RASE (d). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \*\*, ## ( $p \leq 0.001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL.

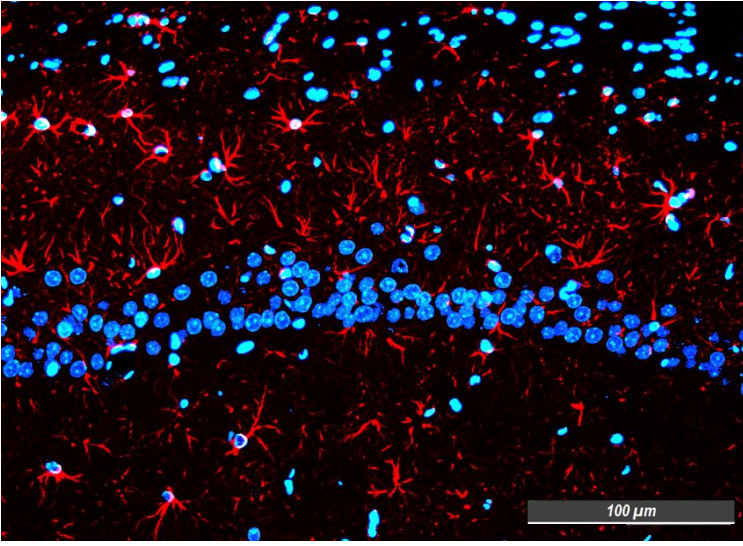
#### *9.2.4 Evaluación de gliosis reactiva.*

La gliosis reactiva (Figuras 13-16), se evaluó a través de inmunofluorescencia con el marcaje contra GFAP, una proteína fibrilar que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto de astrocitos.

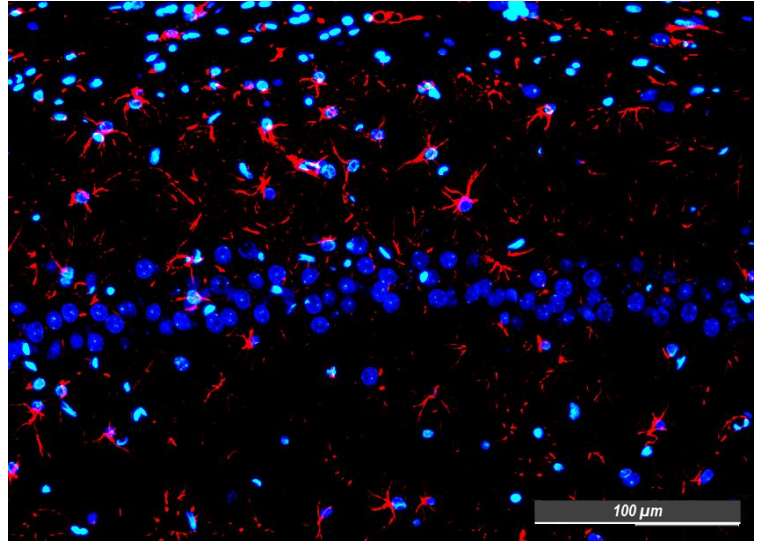
En la Figura 13 se puede observar una reducción significativa en el marcaje contra GFAP del grupo RA (a) al compararlo con el grupo AL (b) en la región de CA1. Posterior a la inducción del SE, en el grupo ALSE 24 h (c) se puede apreciar un incremento en el marcaje positivo, en cambio el grupo RASE 24 h (d) mantiene una distribución y morfología de astrocitos similar a su control (RA), presentando una diferencia significativa (ALSE 24 h vs RASE 24 h). Cinco días posterior a la inducción del SE, se destaca un incremento importante en el inmunomarcaje contra astrocitos en el grupo ALSE (e), alrededor de 4 veces, con respecto al grupo RASE (f) que, aunque incrementa más que su control, no lo hace con la misma significancia que el grupo ALSE. Lo anterior se corroboró de manera cuantitativa en la cuantificación de la densidad integrada por área (g).



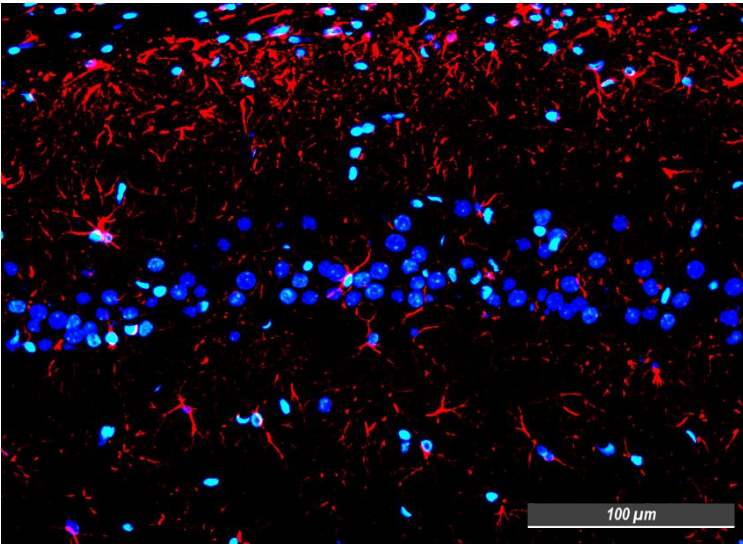
a.



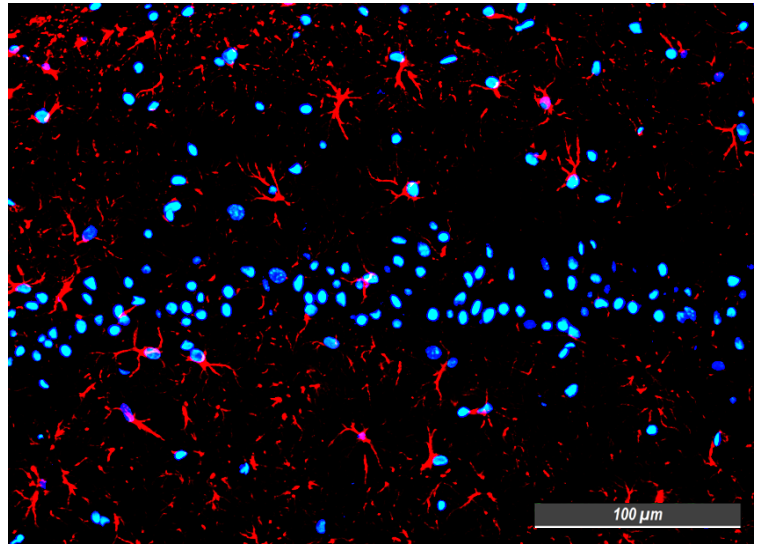
b.



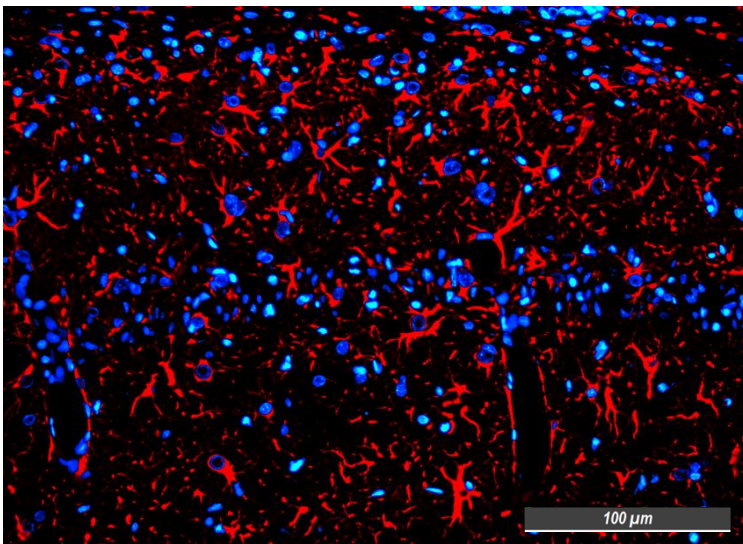
c.



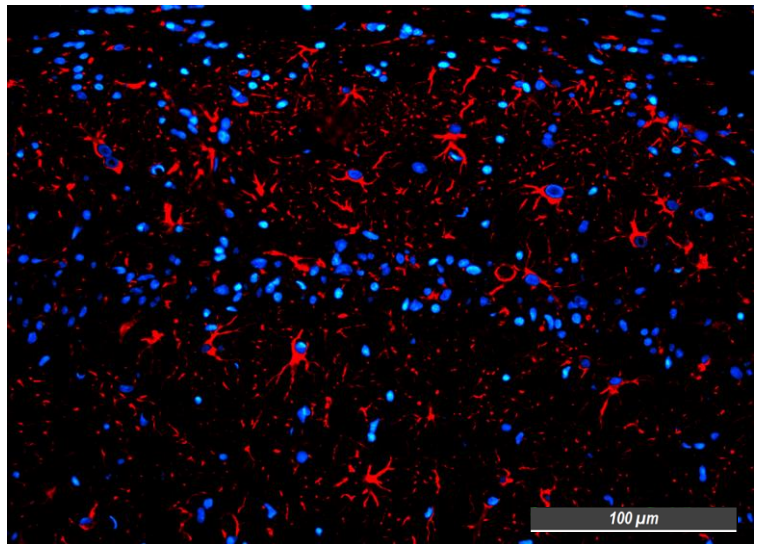
d.

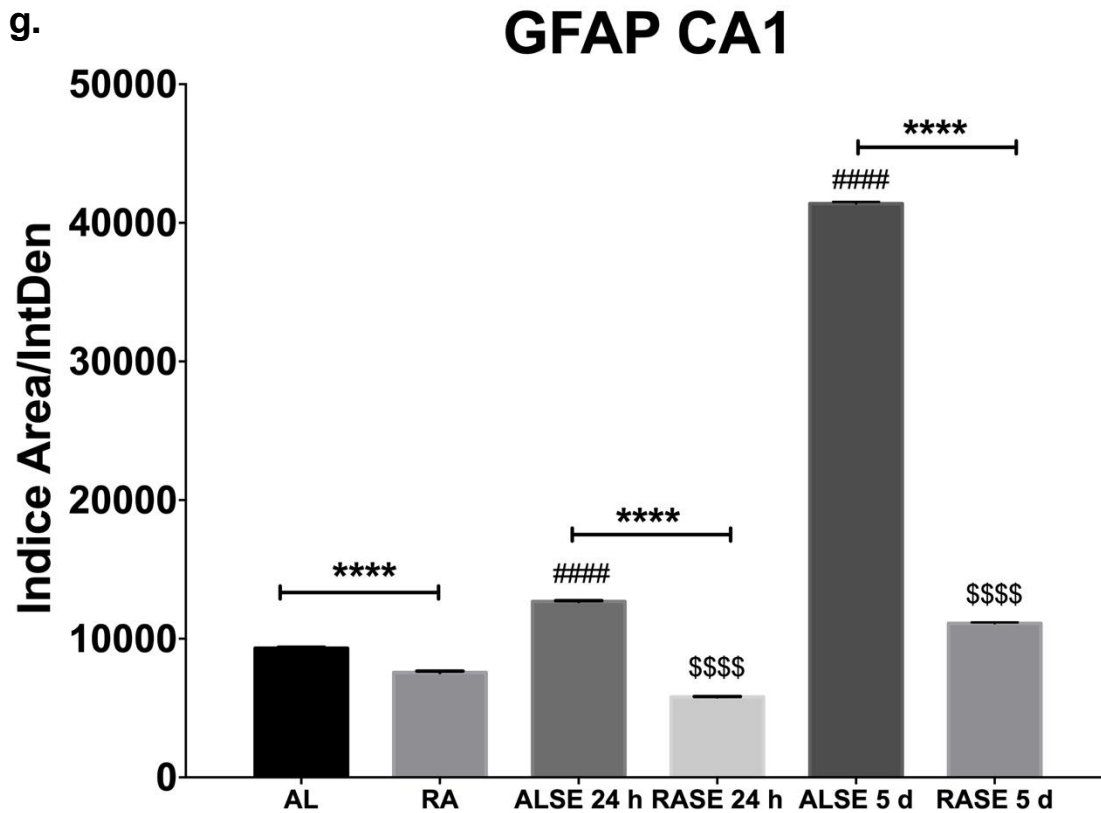


e.



f.





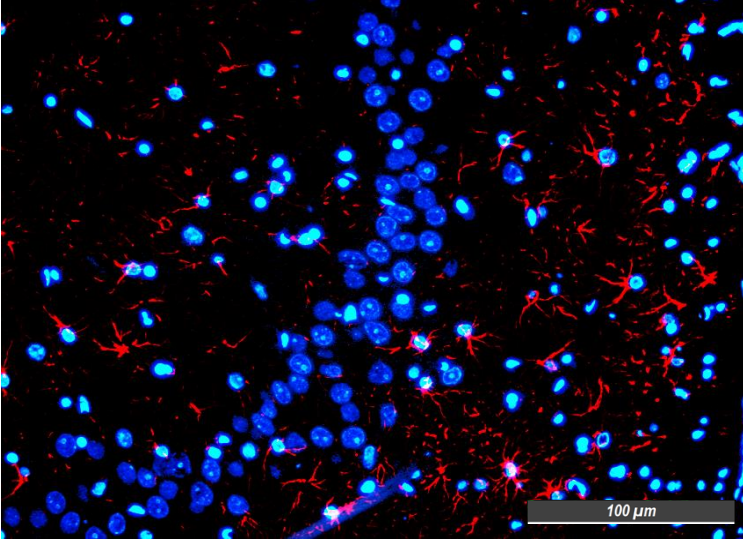
**Figura 13. Inmunofluorescencia de astrocitos en la región CA1.** El marcaje positivo contra GFAP muestra diferencias significativas entre los grupos AL vs RA (a y b). Adicionalmente, los grupos ALSE 24 h y 5 días (c y e) mostraron un aumento significativo en la cantidad de GFAP al compararlos contra el grupo AL (a) y los grupos RASE 24 h y 5 días (d y f). Por otro lado, el grupo RASE 24 h disminuye significativamente su marca contra RA y posteriormente incrementa a los 5 días, pero de manera más discreta, a diferencia de lo observado con ALSE vs AL. En color rojo se observan astrocitos (GFAP) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  fueron considerados significativos. \*\*\*\*, #####, \$\$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.



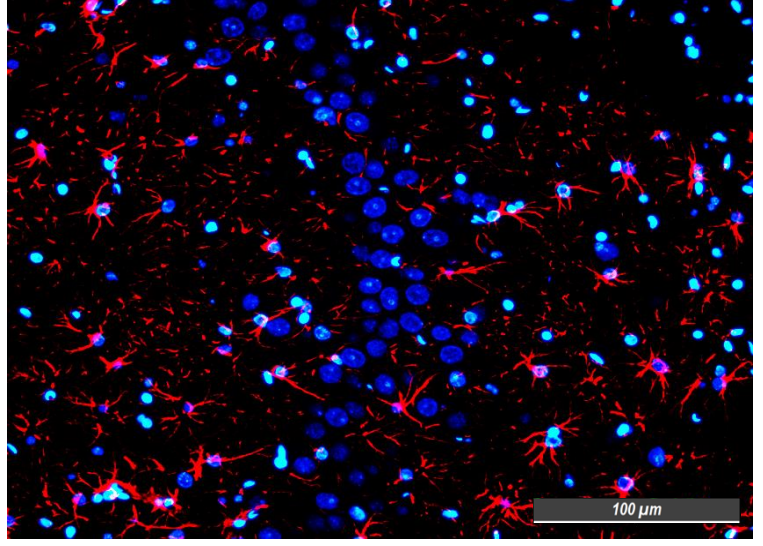
En cuanto a la región de CA3 (Figura 14), el grupo RA (b) presenta un aumento discreto en el marcaje, aunque no es significativo. Sin embargo, al igual que en CA1, el grupo ALSE (c) presenta una mayor marca contra astrocitos a las 24 h post-SE, con su mayor distribución casi exclusiva sobre el *stratum oriens*. A diferencia el grupo RASE 24 h (d) presenta un menor marcaje en comparación con el grupo ALSE 24 h (c), pero estas muestras conservan una distribución más homogénea semejante a su control (RA). A los 5 días post-SE ambos grupos presentan un incremento importante respecto a su control, pero el grupo RASE (f) tiene menor marcaje que el grupo ALSE (e), el cual es significativo. Lo anterior se corroboró con la cuantificación de la densidad integrada por área (g).

Como se ha descrito ampliamente en la literatura, es necesaria la conservación de las interacciones entre astrocitos y neuronas para reducir el riesgo de desarrollar epilepsia después de una convulsión (Seifert & Steinhäuser, 2013; Gibbons et al., 2013; Seifert et al., 2010; Wetherington et al., 2008). Aunado a lo anterior, es importante recordar que CA3 es una región morfológicamente compleja debido a las interconexiones neuronales que tiene con las capas CA1, GD y sobre sí misma, además de la actividad GABAérgica importante que poseen sus neuronas. Por estas razones es considerada una zona de alta sensibilidad e hiperexcitabilidad tanto en procesos epileptogénicos como neurodegenerativos (Taub et al., 1993; Knierim, 2015; Biagini et al., 2005).

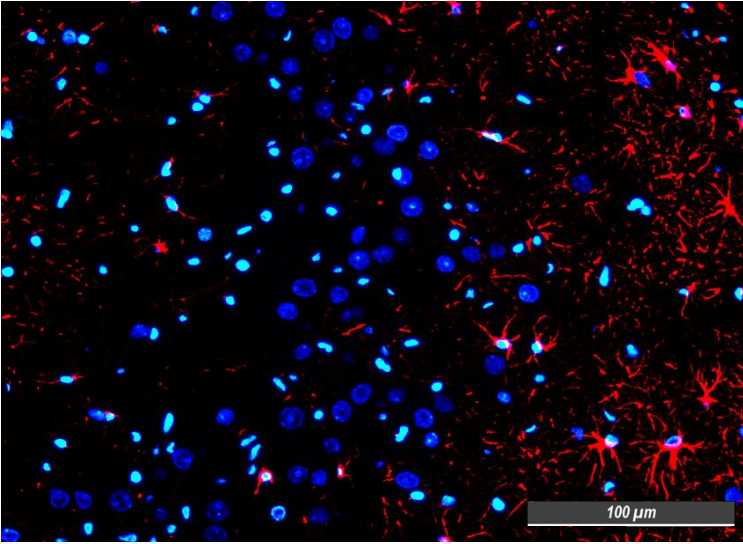
a.



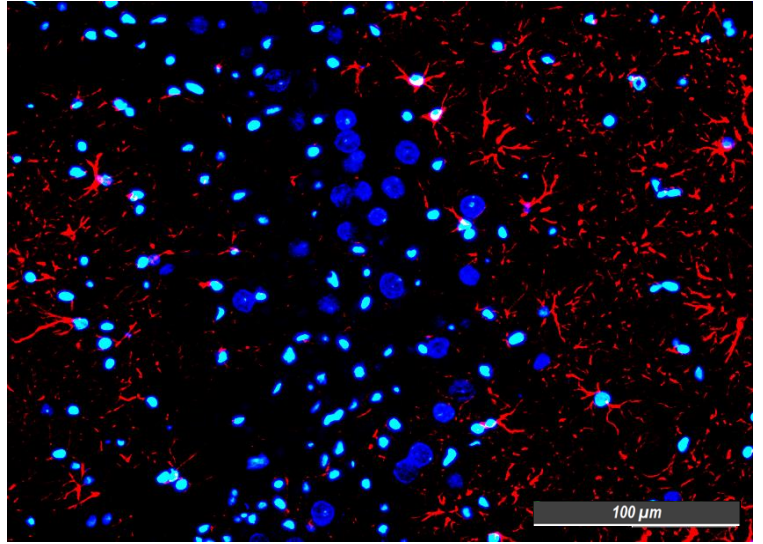
b.



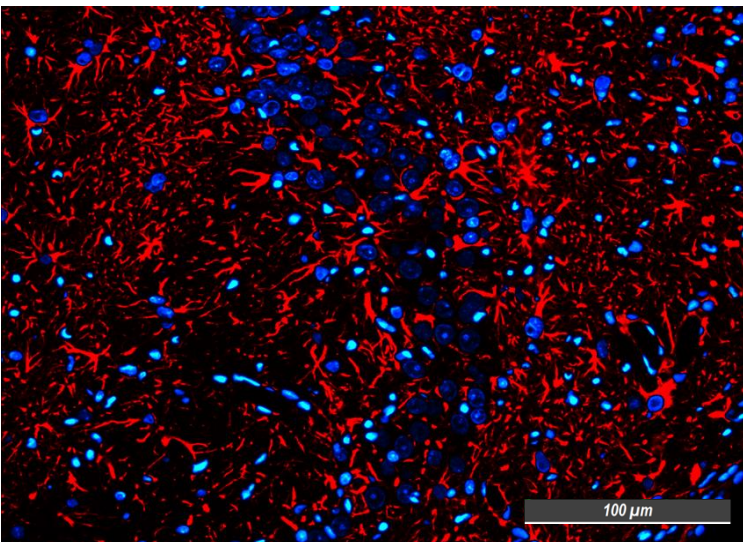
c.



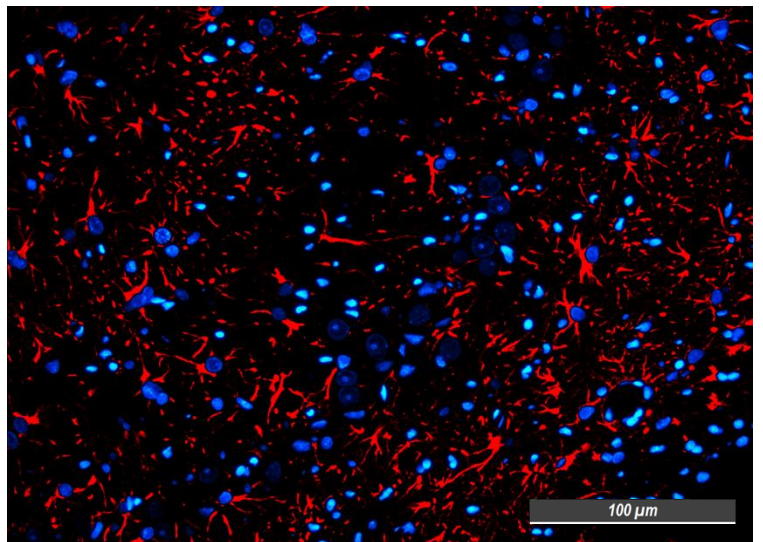
d.



e.

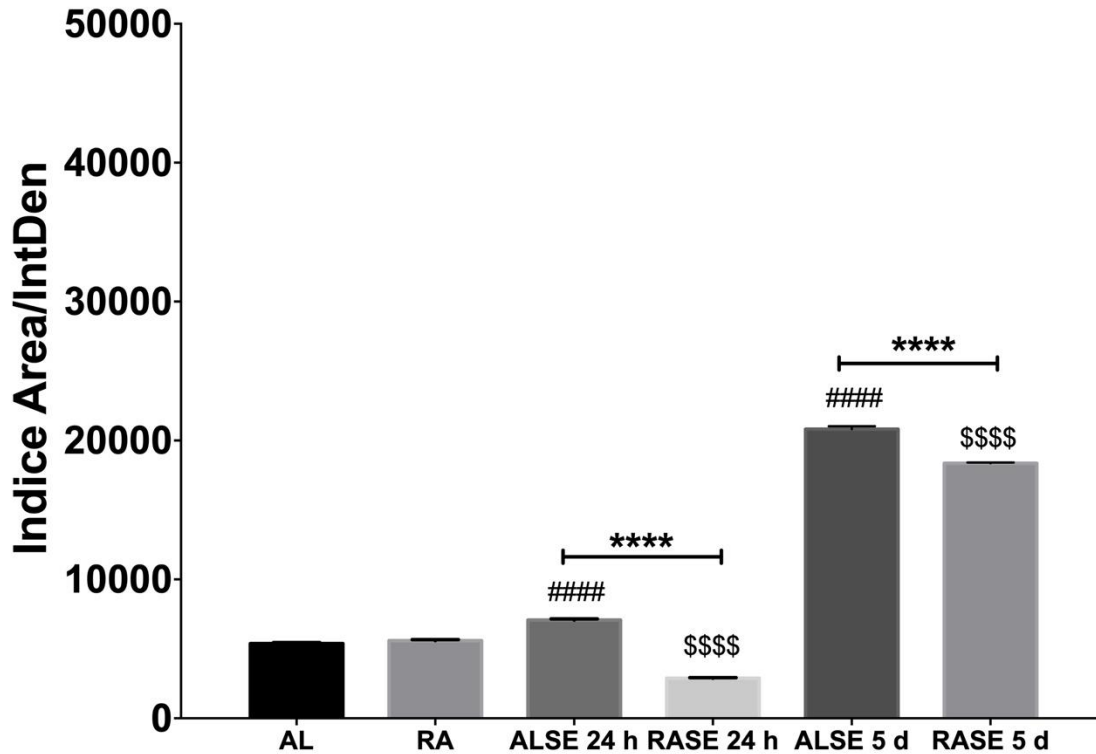


f.



g.

## GFAP CA3

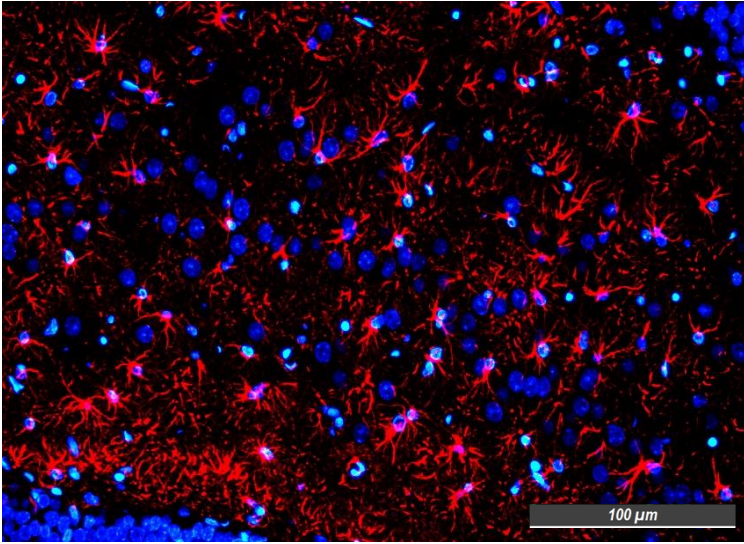


**Figura 14. Inmunofluorescencia de astrocitos en región CA3.** El marcaje positivo contra GFAP no mostró diferencias significativas entre los grupos AL vs RA. (a y b) sin presentar cambios en la distribución de la región. En contraste, el grupo ALSE 24 h (c) mostró un aumento en la densidad integrada comparado contra el grupo AL (a y c), con una distribución desplazada hacia el *stratum oriens*, a diferencia del grupo RASE 24 h (d) donde disminuye la marca y se mantiene una distribución similar al control RA (b). Finalmente, a los 5 días post-SE en ambos grupos (e y f) la marca contra GFAP incrementa de manera significativa contra sus respectivos controles, pero entre ambos, el grupo RASE tiene menor marcaje. En color rojo se observan astrocitos (GFAP) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \*\*\*\*, #####, \$\$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

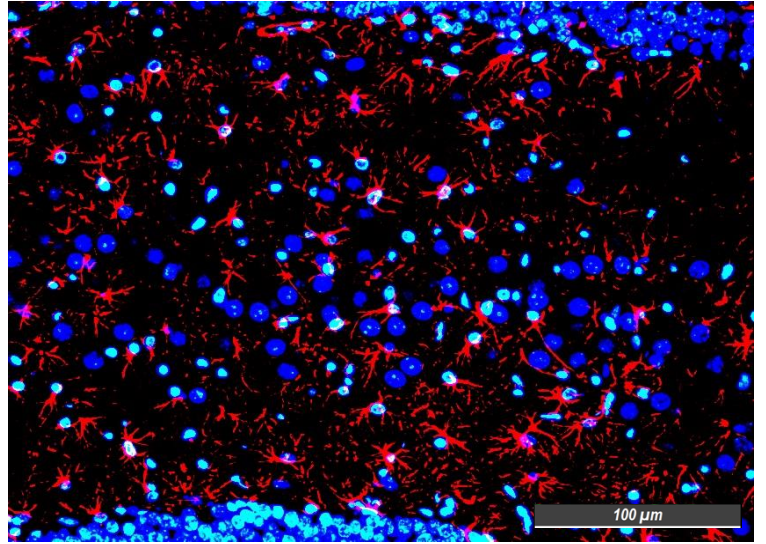
En la Figura 15 se puede ver la expresión de GFAP en la región del hilus, observándose un incremento del marcaje positivo contra astrocitos en el grupo RA (b) vs AL (a) cuya diferencia es significativa. Posteriormente a las 24 h del SE (c y d) es interesante resaltar que en ambos grupos disminuye la marca contra GFAP, y esto quizá se deba a la muerte celular o migración de astrocitos hacia otra región. Sin embargo, a pesar de que el grupo RASE 24 h (d) tiene menor marcaje positivo que el grupo ALSE (c), éste mantiene una distribución semejante a su control. A los 5 días post-SE ambos grupos (e y f) presentan un incremento en la marca contra astrocitos, en niveles similares a sus respectivos controles. Lo anterior se corroboró con la cuantificación de la densidad integrada por área (g).



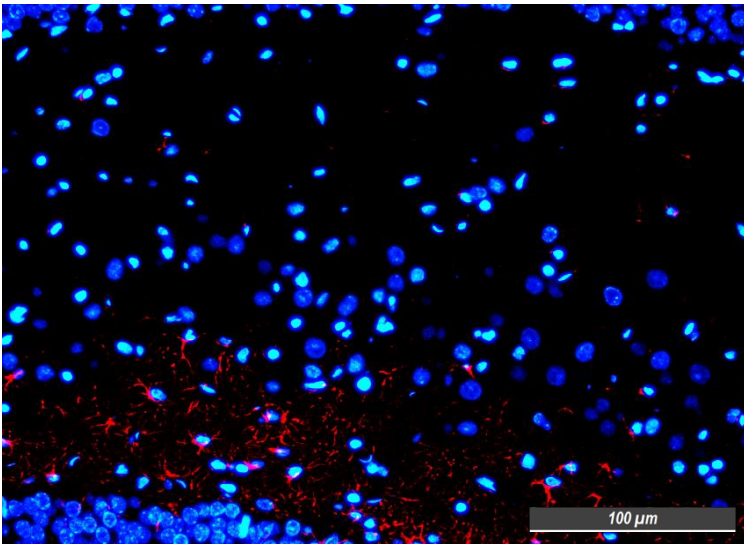
a.



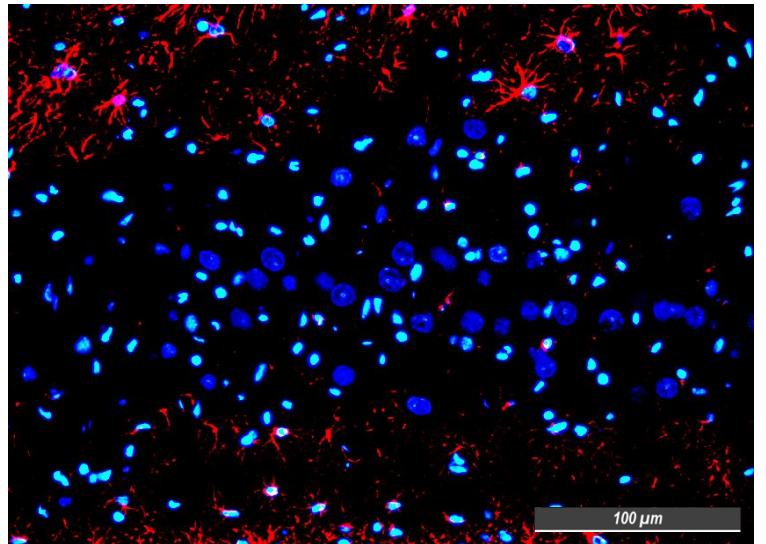
b.



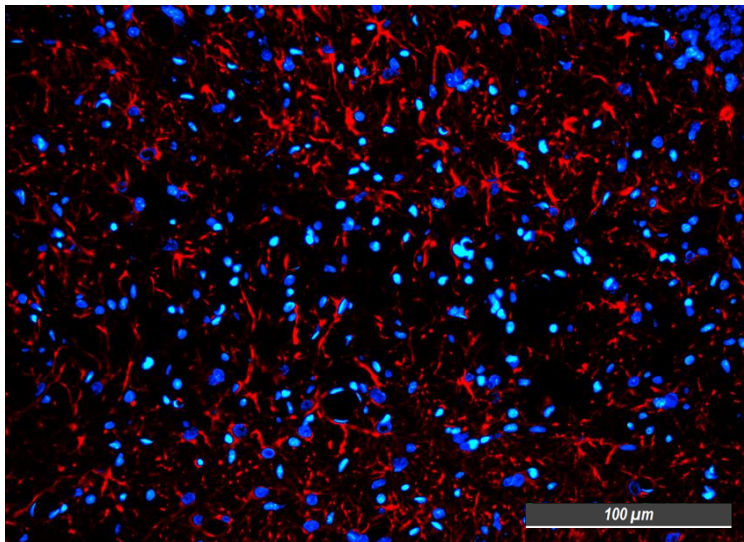
c.



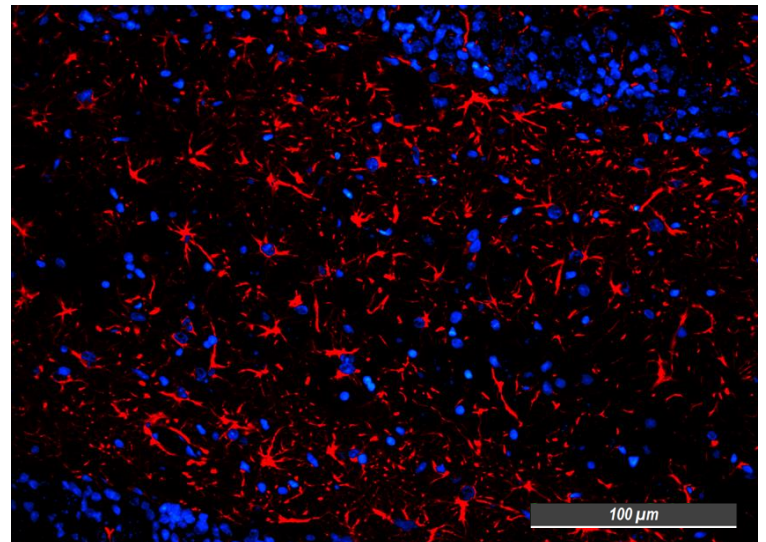
d.



e.

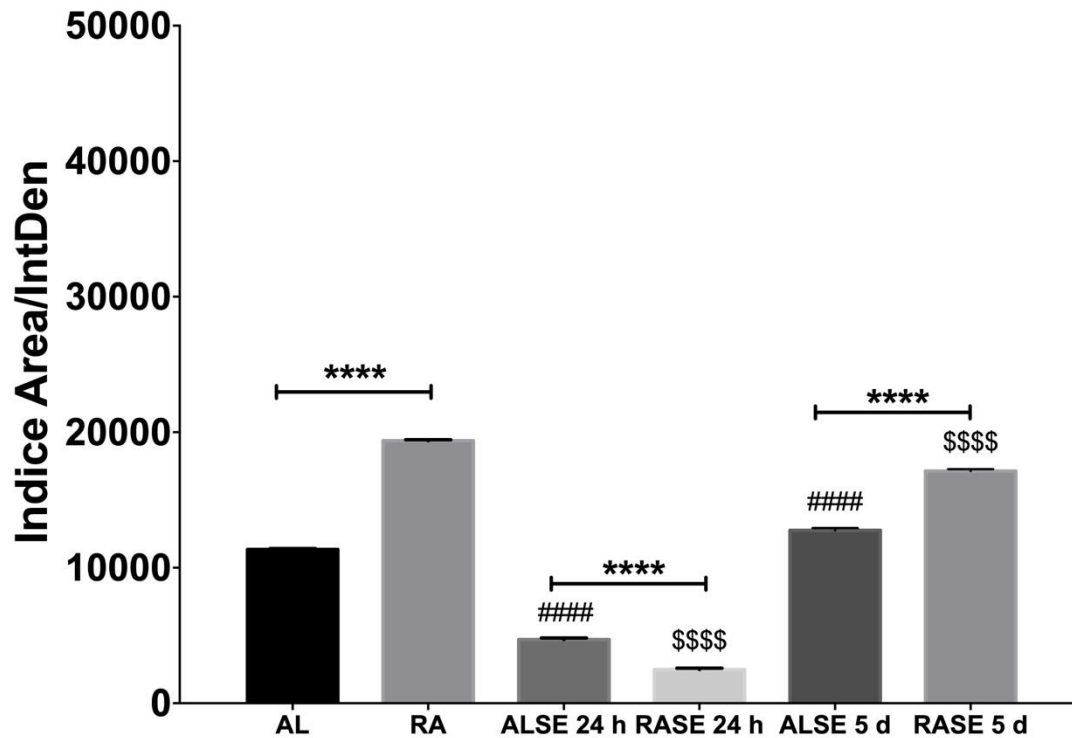


f.



g.

## GFAP hilus

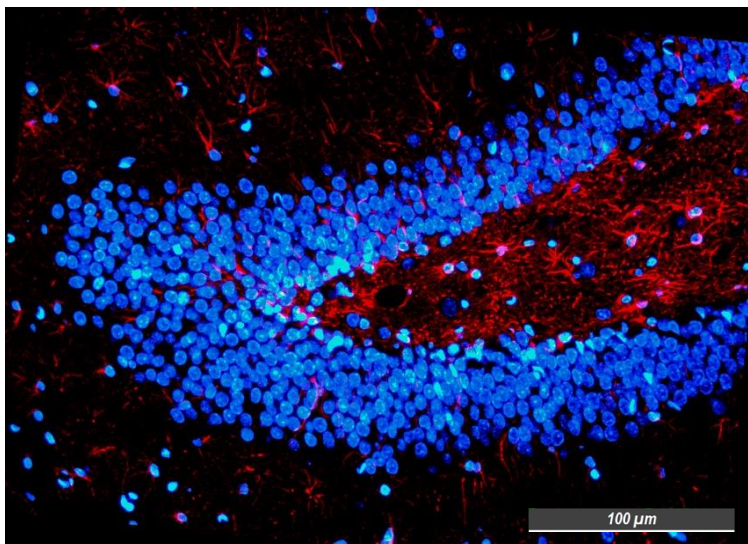


**Figura 15. Inmunofluorescencia de astrocitos en región del hilus.** En esta región, el marcaje positivo contra GFAP mostró diferencias significativas en RA (b) comparado contra AL (a), pero ambos grupos muestran una distribución homogénea en la región. A las 24 h post-SE ambos grupos (c y d) muestran una reducción significativa en la cantidad de GFAP, comparados contra su control, y esta reducción es significativa entre ambos. Por otra parte, a los 5 días entre ambos hay una diferencia significativa, aunque el grupo ALSE (e) muestra un incremento respecto a AL, y RASE (f) una reducción respecto a RA. En color rojo se observan astrocitos (GFAP) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  fueron tomados como significativos. \*\*\*\*, #####, \$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

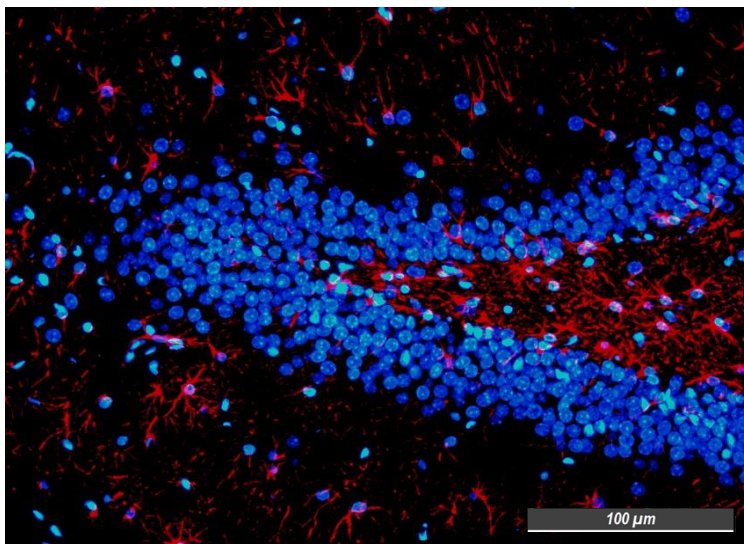
Finalmente, se cuantificó el marcaje positivo contra astrocitos en la región del GD (Figura 16). En este caso, al igual que en la región del hilus, se puede observar un incremento de astrocitos en el grupo con RA (b), el cual es significativo. Posteriormente, a las 24 h post-SE el grupo ALSE (c) presenta un incremento respecto a su control, y el grupo RASE (d) una reducción en la cantidad de GFAP, cuya diferencia entre ambos grupos es significativa. A los 5 días ambos grupos (e y f) incrementan la cantidad de GFAP respecto a su control y no se observan diferencias entre ambos. Sin embargo, el incremento en el grupo ALSE 5 días es del doble comparado contra AL, a diferencia del grupo RASE donde el incremento es discreto comparándolo contra su control (RA). Lo anterior es corroborado con la cuantificación de la densidad integrada por área (g). Con los resultados presentados hasta el momento, se puede afirmar que la RA modifica la cantidad del marcaje contra astrocitos y esta respuesta es distinta en cada región del hipocampo.



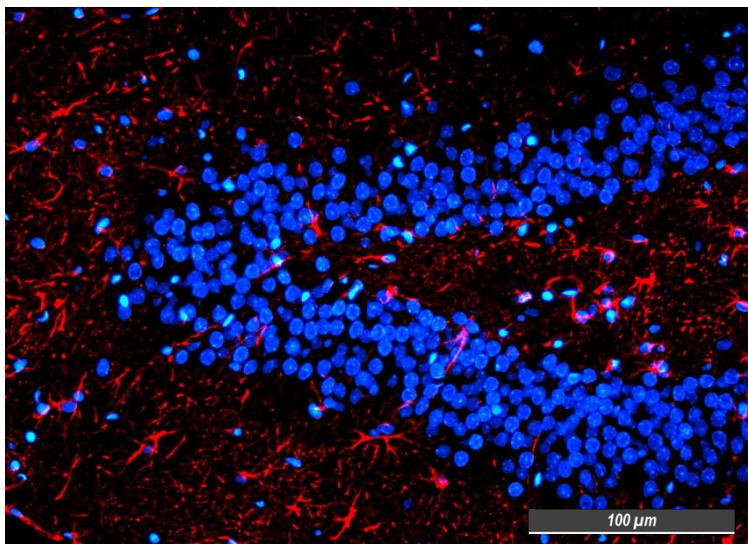
**a.**



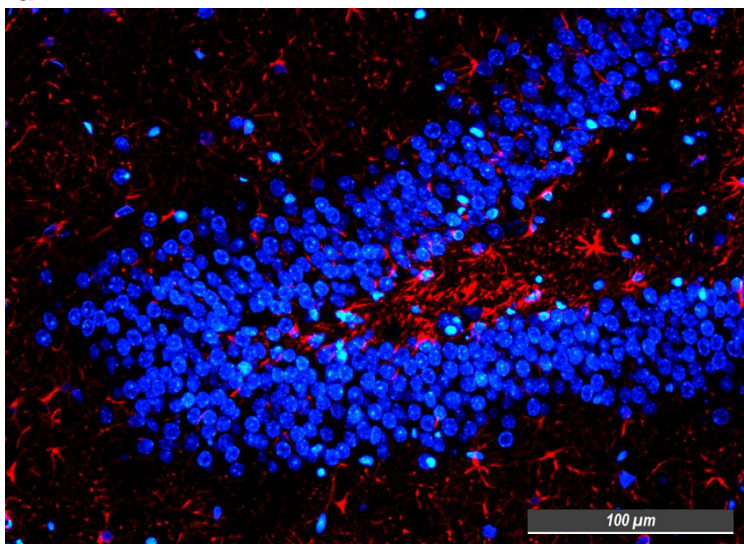
**b.**



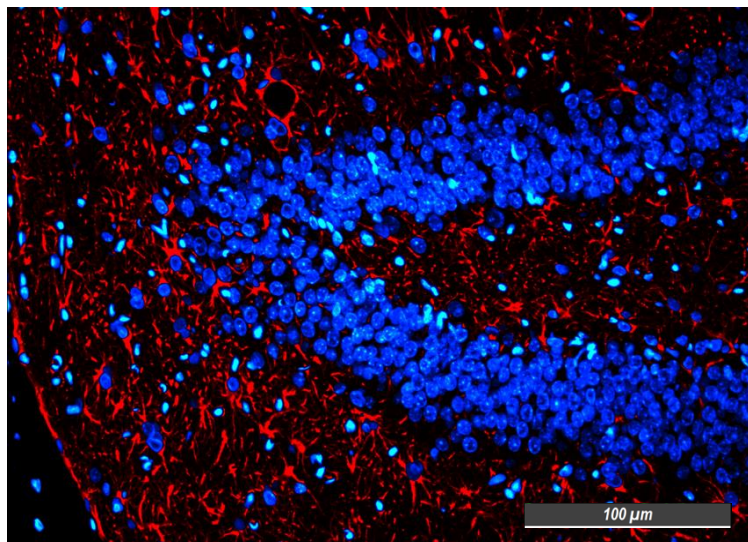
**c.**



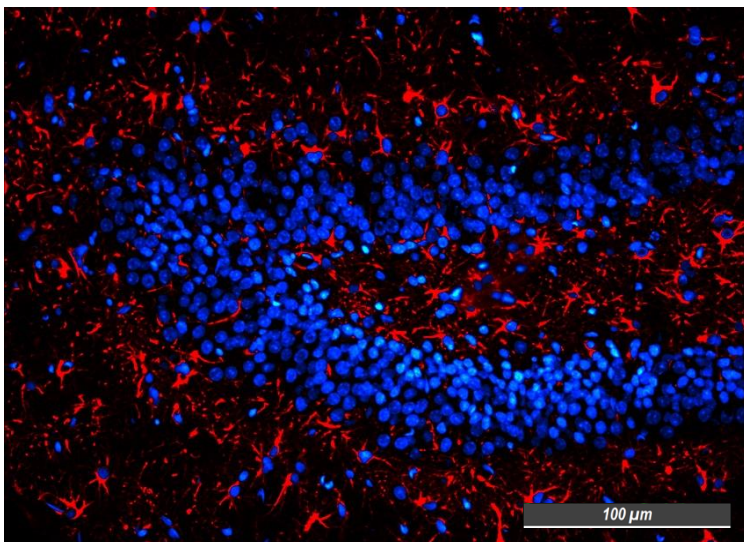
**d.**



**e.**



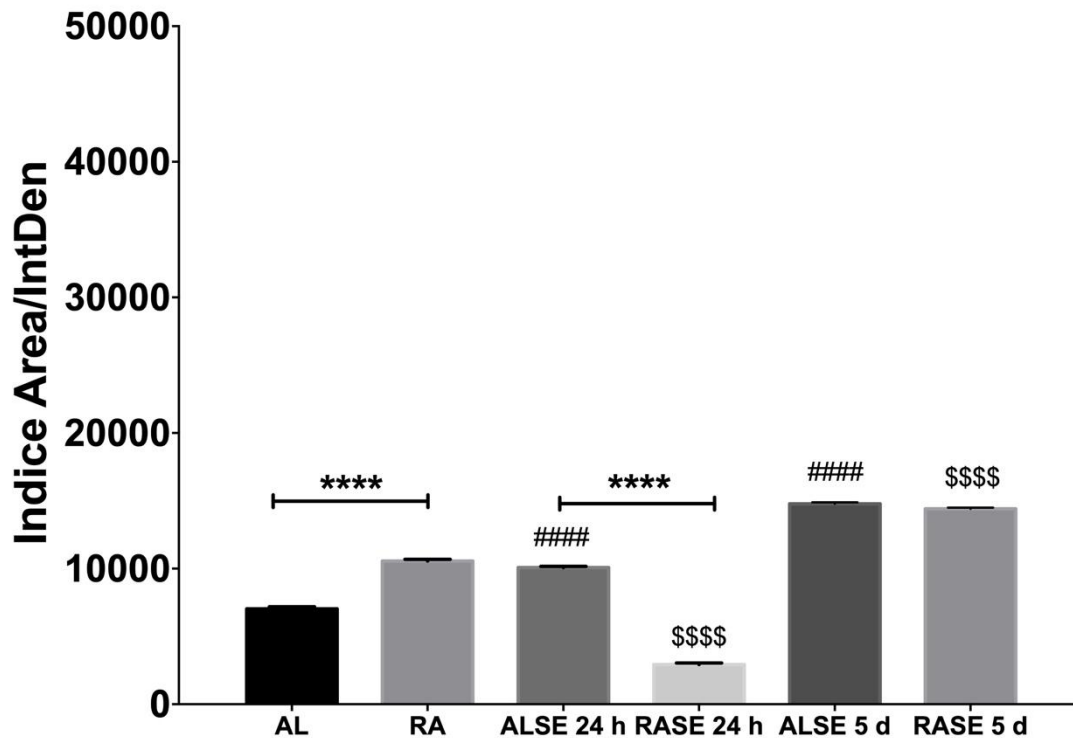
**f.**





g.

## GFAP GD



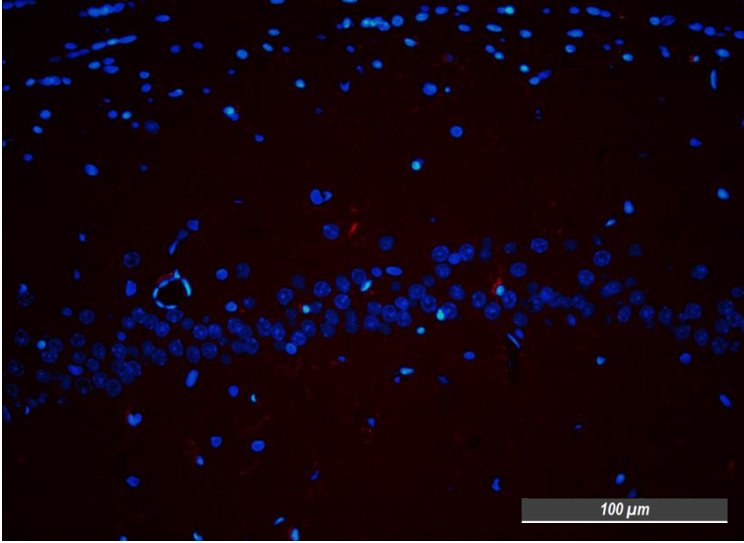
**Figura 16. Inmunofluorescencia de astrocitos en región del giro dentado (GD).** En esta región se observa como los animales tratados con RA (b) muestran un incremento significativo comparado con los alimentados AL (a). Posterior a la inducción del SE, el grupo ALSE 24 h (c) aumenta de manera significativa la marca contra GFAP, a diferencia del grupo RASE 24 h (d) en donde se observa un decremento significativo en el marcaje comparado contra los grupos RA y ALSE 24 h. Posteriormente, a los 5 días incrementa en ambos grupos (e y f) la marca de GFAP sin ser significativa esta diferencia entre ambos grupos. Sin embargo, el incremento en RASE vs RA (f vs b) es solo de una tercera parte, y en ALSE vs AL (e vs a) el incremento es del doble. En color rojo se observan astrocitos (GFAP) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron significativos. \*\*\*\*, ####, \$\$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

### 9.2.5 Evaluación de la microglía.

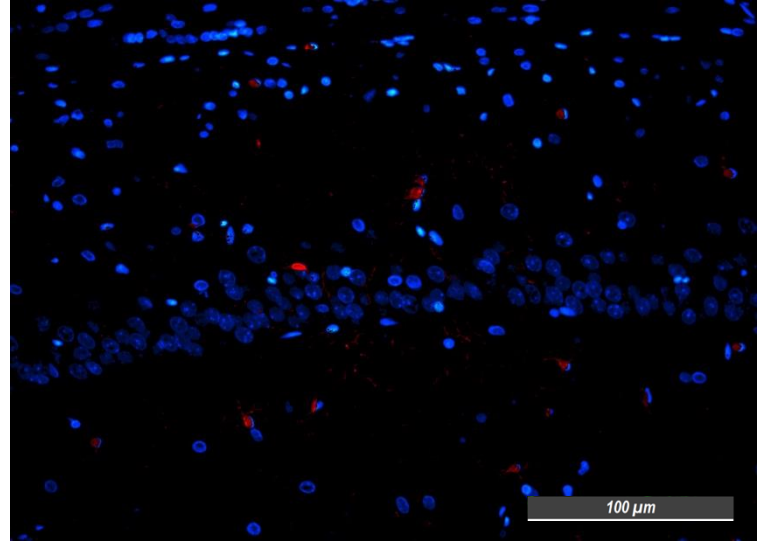
Por otra parte, se evaluó el marcaje positivo de la microglía, mediante inmunofluorescencia utilizando el marcador contra la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (Iba-1). Es una proteína de unión al calcio específica para microglía/macrófagos, tiene actividad en el agrupamiento de actina, participa en el plegamiento de membrana y la fagocitosis en la microglía activada. En la región CA1 (figura 17), se encontró un incremento significativo en el grupo RA (b) respecto al grupo AL (a).

Después de la inducción del SE, en el grupo ALSE 24 h (c) se observa un leve incremento que es significativo contra el grupo AL. Por otro lado, el grupo RASE 24 h (d) disminuye discretamente la marca con respecto a su control (RA), sin ser significativa esta reducción, pero la cuantificación es significativa contra el grupo ALSE 24 h. A los 5 días de la inducción del SE, en ambos grupos se incrementa la cantidad de Iba-1 pero en el grupo ALSE 5D (e) este incremento es casi 30 veces más respecto al grupo AL, a diferencia del grupo RASE 5D (f) en el cual el incremento es solo de 4 veces el valor de RA. Entre ambos grupos (ALSE 5D vs RASE 5D) hay una evidente diferencia significativa de poco más del doble (g).

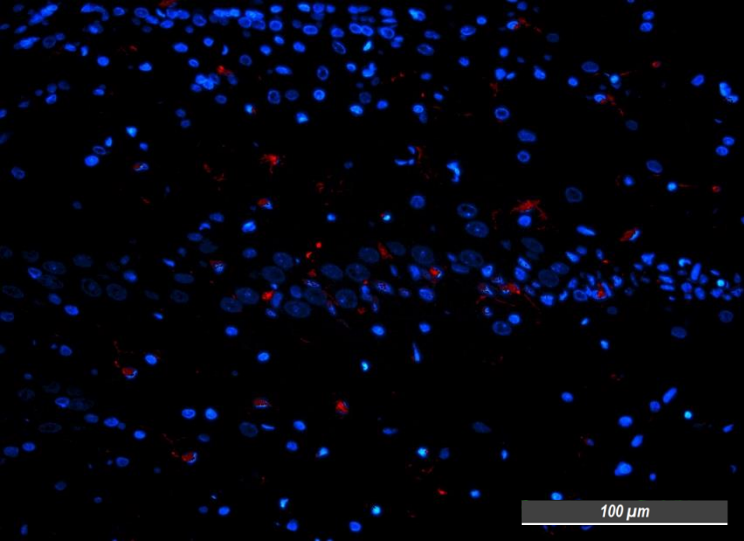
a.



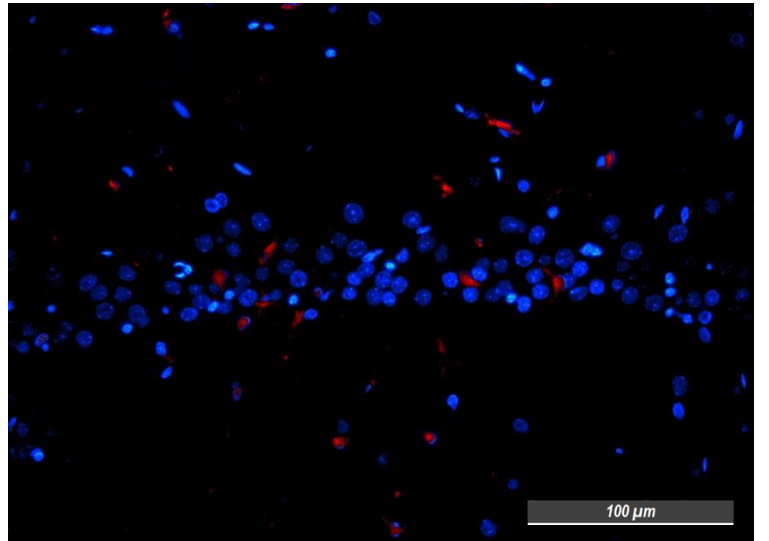
b.



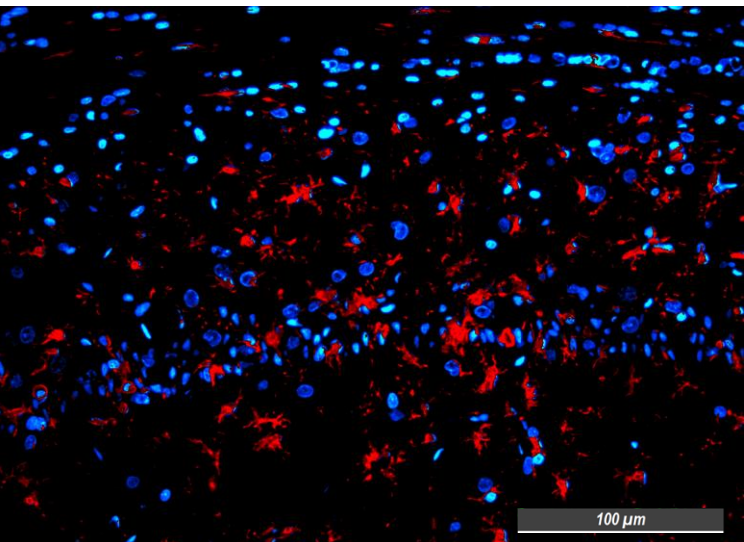
c.



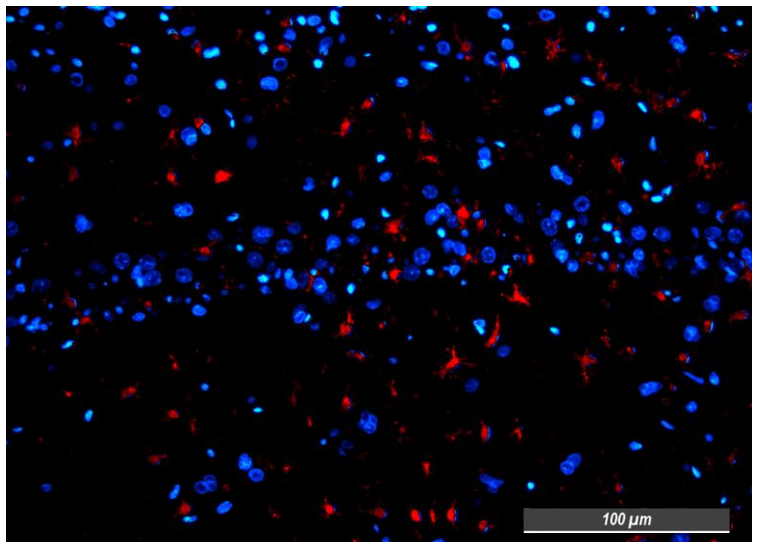
d.



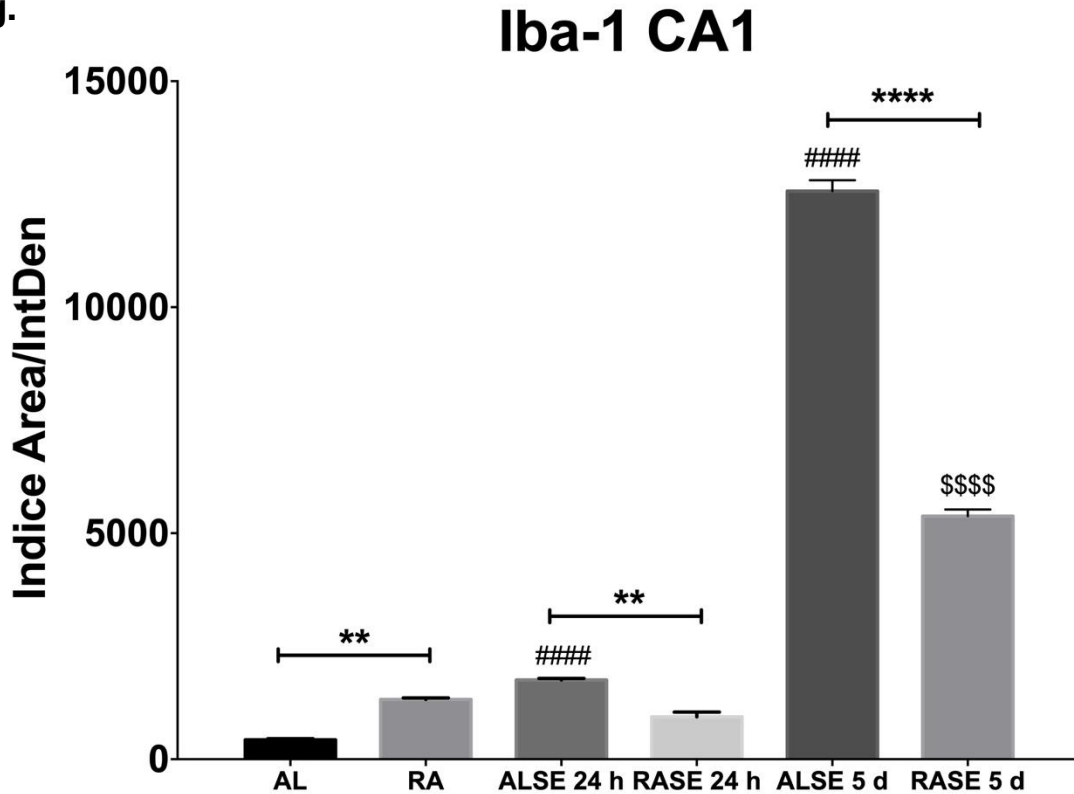
e.



f.



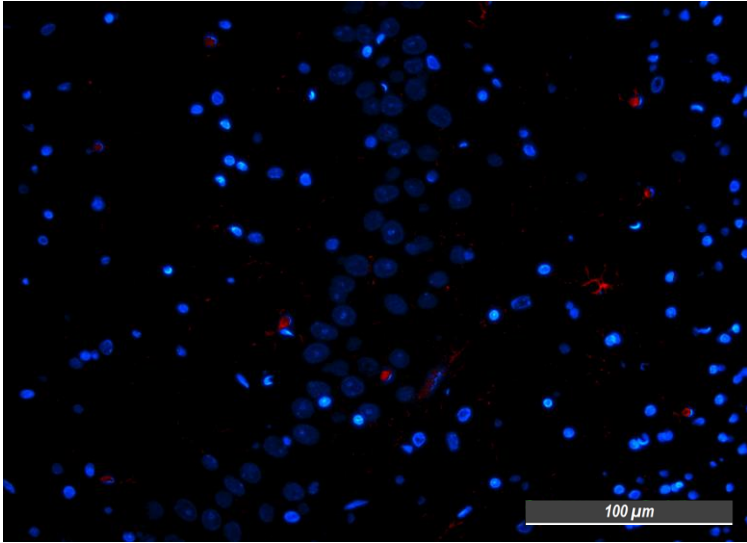
g.



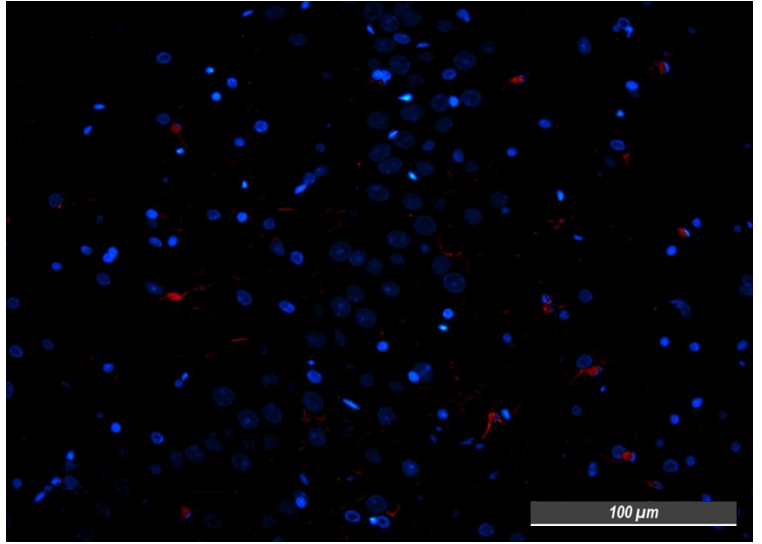
**Figura 17. Inmunofluorescencia de la microglía en la región de CA1.** En esta región el grupo RA (b) aumenta significativamente el marcaje contra Iba-1, en comparación con el grupo AL. Posterior a la inducción del SE, a las 24 h incrementa en ALSE (c) con respecto a AL, a diferencia de RASE (d) que disminuye discretamente sin ser significativo este cambio. Asimismo, entre ambos grupos existe un aumento significativo por parte de ALSE. Cinco días después del SE, aumenta significativamente la marca en ambos grupos (e y f), cabe señalar que, en el grupo ALSE (e) esto ocurre de forma sustancial, cerca de 29 veces más que AL. En cambio, el incremento en el grupo RASE (f) menor, solo 4 veces respecto RA, y entre ambos hay un aumento significativo por parte de ALSE (e). En color rojo se observan astrocitos (Iba-1) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \*\* ( $p \leq 0.001$ ); \*\*\*\*, #####, \$\$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

En la Figura 18, se puede observar al igual que en CA1, que durante la RA (b) aumenta la cantidad de microglía en la región de CA3. Veinticuatro horas posterior a la inducción del SE, en ambos grupos aumenta la cantidad de Iba-1 contra sus respectivos controles, aunque el incremento en RASE (d) es menor. En adición, no se observan diferencias entre ambos grupos a las 24 h. Para el caso de 5 días posterior al SE, ambos grupos incrementan el marcaje positivo contra Iba-1, sin diferencias entre ALSE (e) vs RASE (f), pero si contra sus controles (g).

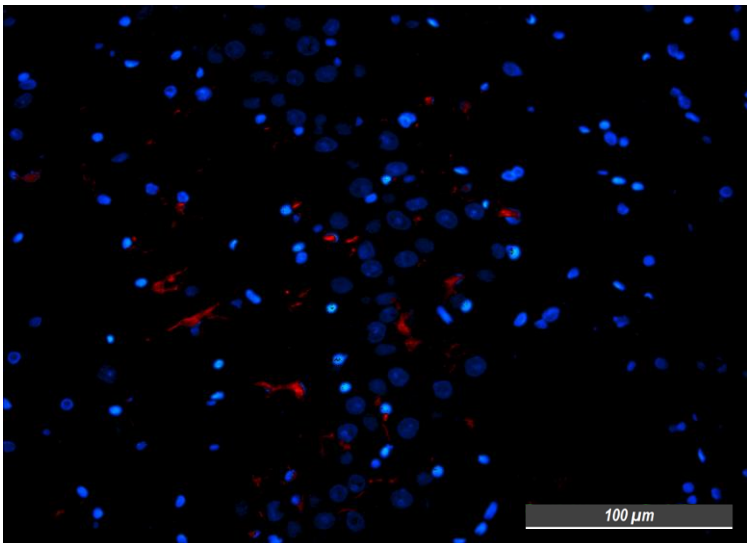
a.



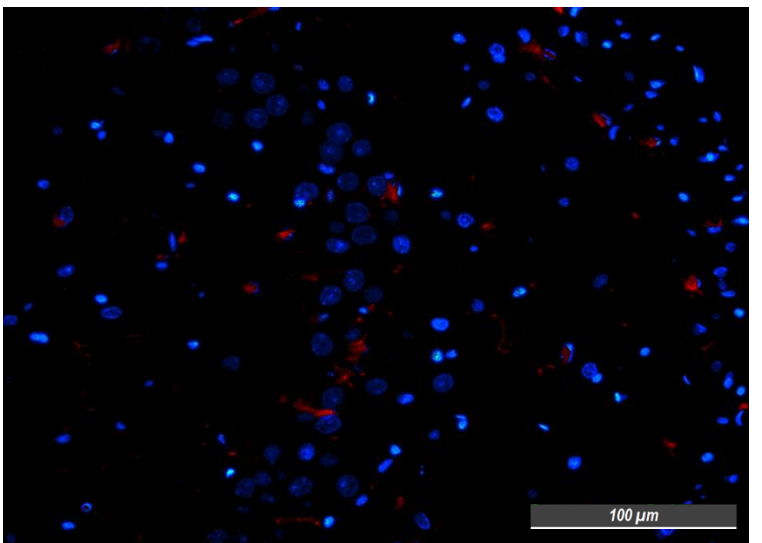
b.



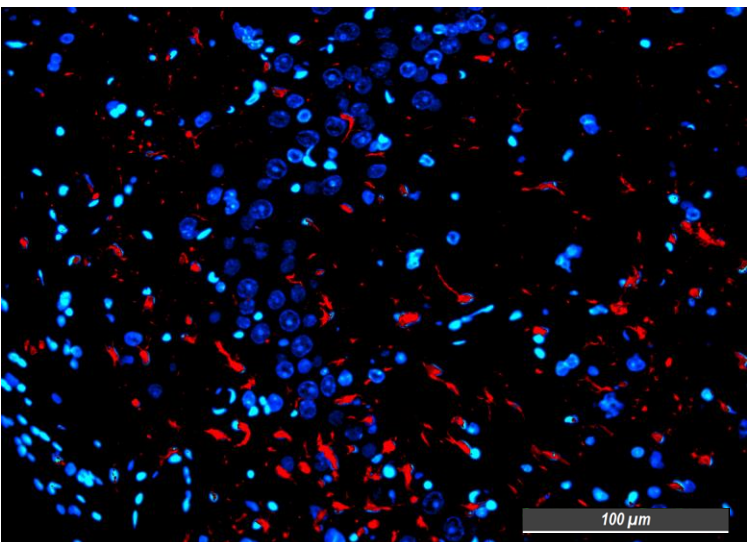
c.



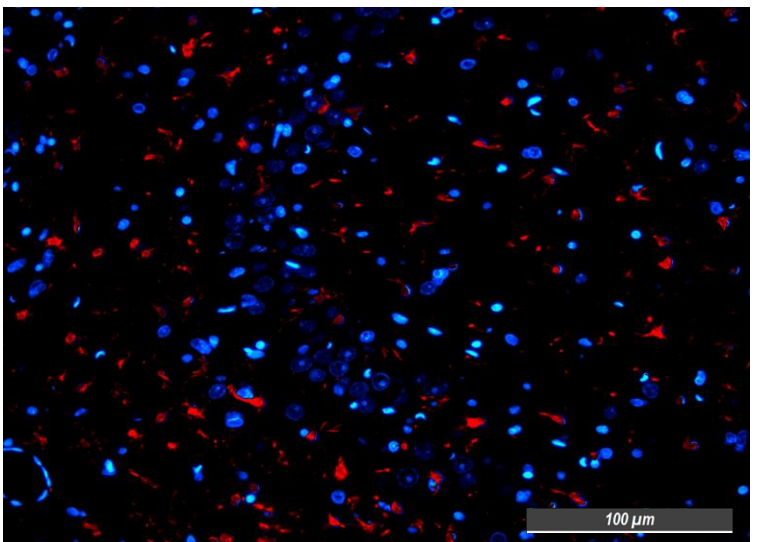
d.



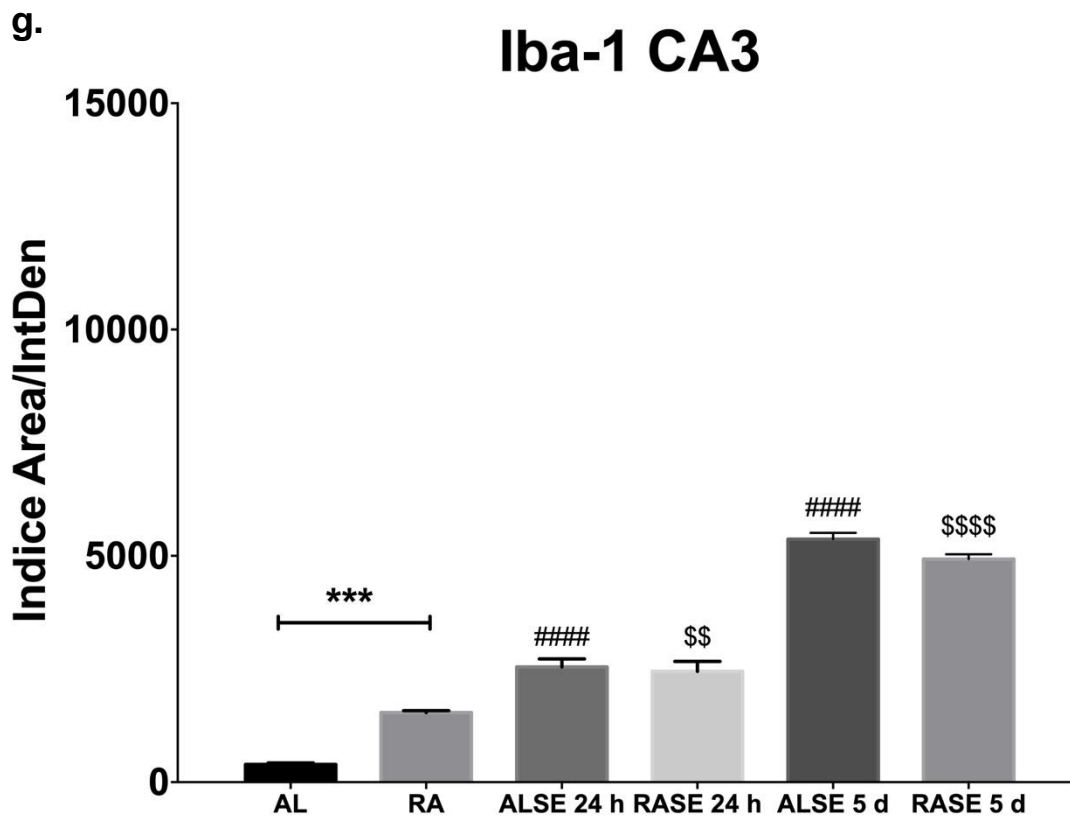
e.



f.





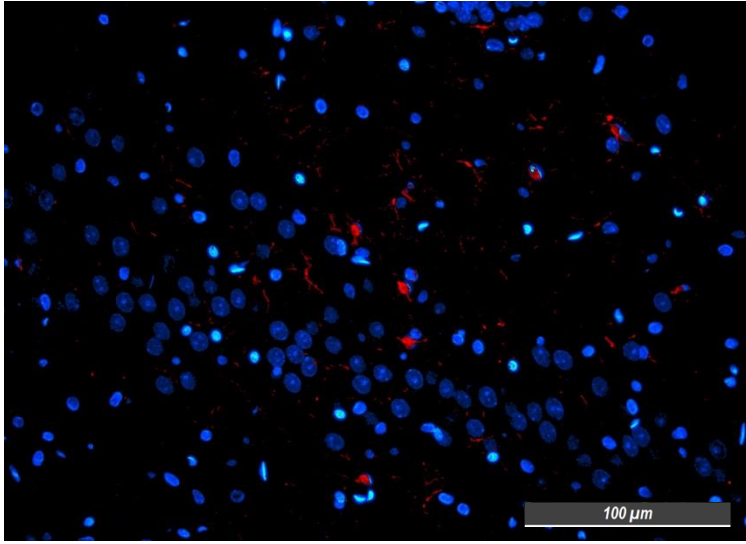


**Figura 18. Inmunofluorescencia de microglía (Iba-1) en la región de CA3 del hipocampo.** La RA (b) produce una mayor marca contra Iba-1, que lo observado en AL (a). Veinticuatro horas post- SE incrementa la marca en ambos grupos sin tener significancia entre ambos, pero si contra sus respectivos controles; sin embargo, en AL vs ALSE (c) es mayor el aumento, comparado contra lo observado en RA vs RASE. A los 5 días post-SE (e y f) aumenta en ambos grupos la marca contra Iba-1 sin diferencias significativas entre ellos (e y f), pero si contra sus respectivos controles. En color rojo se observan astrocitos (Iba-1) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \$\$ ( $p \leq 0.001$ ), \*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ); ####, \$\$\$\$ ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

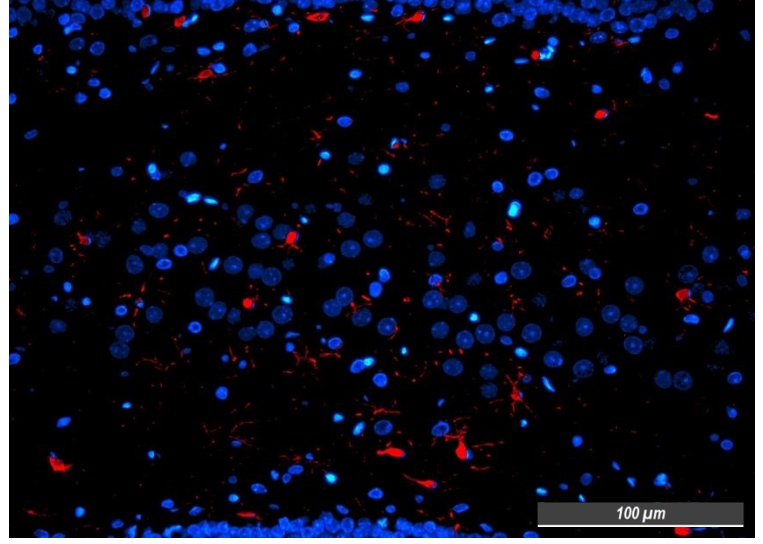
Continuando con la cuantificación de Iba-1, en la figura 19 puede observarse que en la región del hilus hay un incremento de microglía en el grupo RA (b) en comparación con el grupo AL (a). Posteriormente, a las 24 h post-SE hay un incremento significativo en el grupo ALSE (c) vs AL, a diferencia del grupo RASE (d) donde hay una disminución comparado con RA, la cual también es significativa y sin diferencias entre los grupos ALSE vs RASE. Cinco días después de la inducción del SE, la marca de Iba-1 en ALSE (e) aumenta significativamente 19 veces respecto a su control, en contraste con lo observado en el grupo RASE (f), donde el valor de la marca contra Iba-1 se mantiene al mismo nivel de su control (RA). Cabe destacar que a los 5 días post-SE la cantidad de Iba-1 del grupo ALSE se triplica con respecto a la cuantificación medida en el grupo RASE (g).



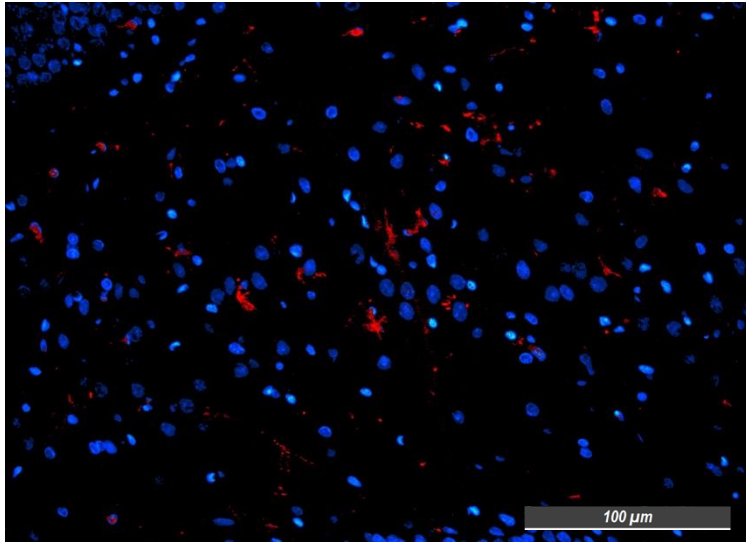
a.



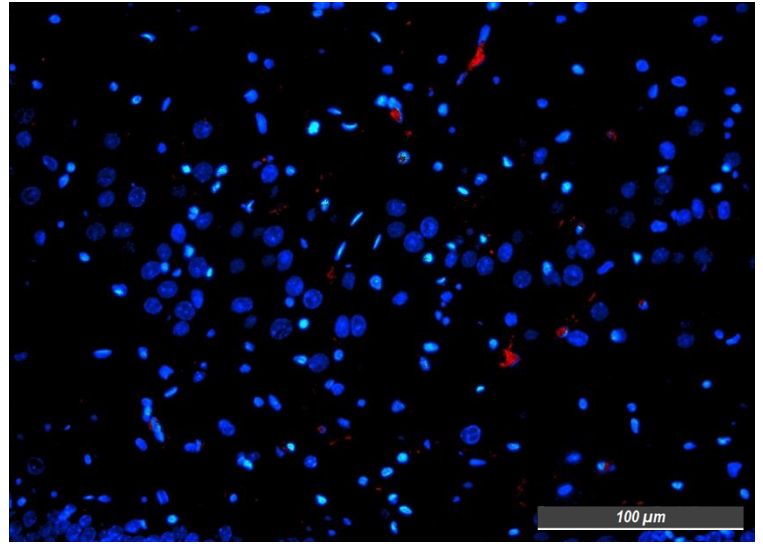
b.



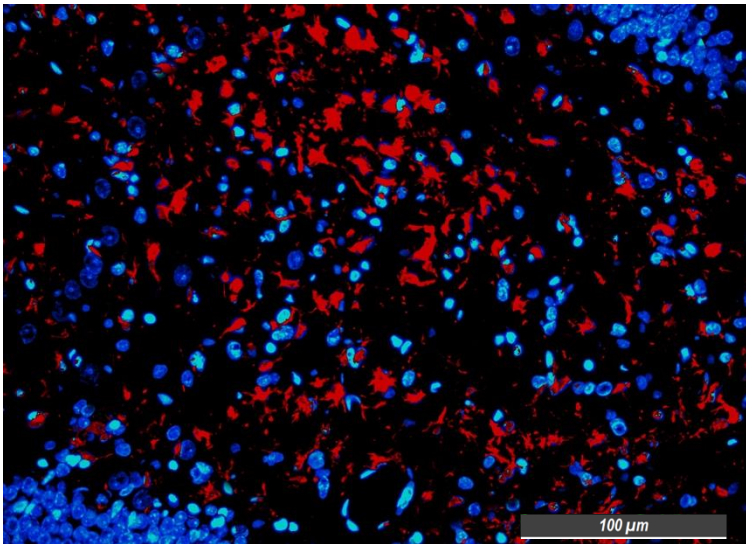
c.



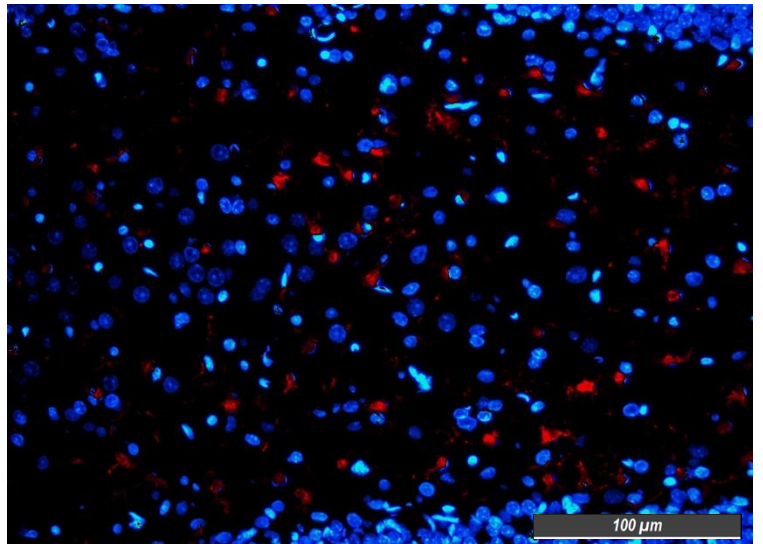
d.



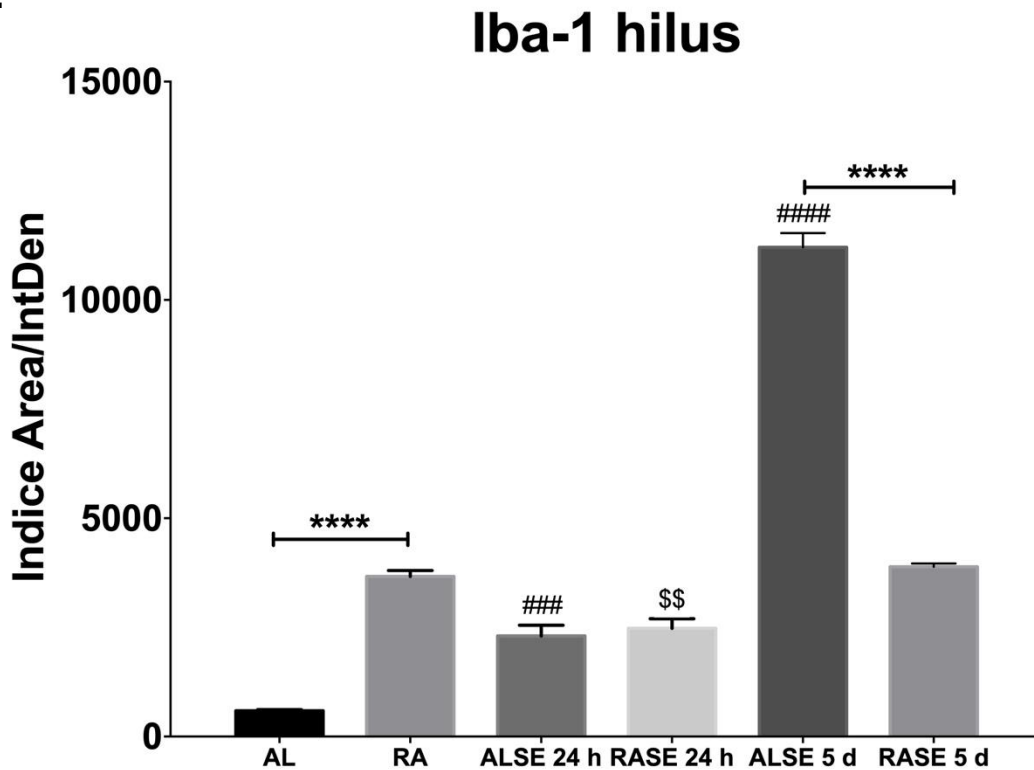
e.



f.



g.

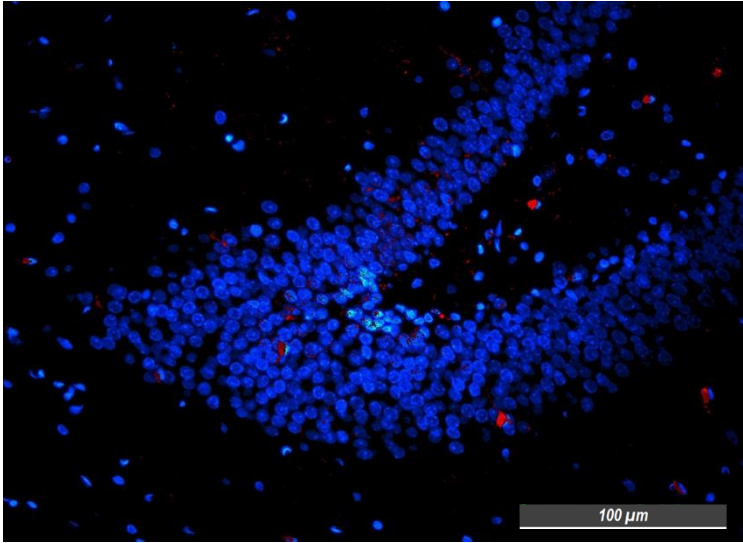


**Figura 19. Inmunofluorescencia de las células microgliales (Iba-1) en la región del hilus.** Consistentemente con las regiones anteriores, la RA (b) presenta un mayor marcaje contra microglía, en comparación con AL (a). Posterior al SE, en el grupo ALSE 24 h (c) aumenta la marca contra Iba-1 con respecto a AL (a), al contrario de RASE 24 h (d) en el cual disminuye significativamente contra RA. A los 5 días hay un incremento importante en ALSE (e), a diferencia de RASE (f) donde la cantidad de Iba-1 es semejante a la de RA, en este punto si hay diferencias significativas entre ambos grupos (e y f). En color rojo se observan astrocitos (Iba-1) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$ , se consideraron como significativos. \$\$ ( $p \leq 0.001$ ); ### ( $p \leq 0.0001$ ); \*\*\*\*, #### ( $p \leq 0.00001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL. El símbolo \$ representa la diferencia significativa contra el grupo RA.

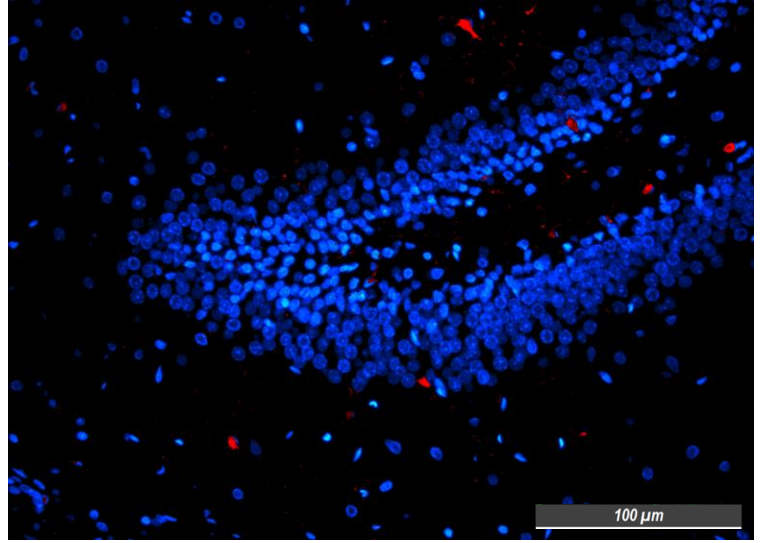
Finalmente, en la región de GD (figura 20) y como se aprecia de manera constante en las demás regiones, la RA (b) tiene un incremento significativo en el marcaje positivo contra Iba-1, respecto al grupo AL (a). Posterior al SE, ambos grupos, ALSE (c) y RASE (d), incrementan su marcaje contra sus respectivos controles; sin embargo, sólo en el grupo ALSE esta diferencia es significativa. A los 5 días de la inducción en el grupo ALSE (e) se mantiene ese incremento significativo contra el grupo AL, contrario a lo observado en el grupo RASE (f), en el cual el marcaje contra Iba-1 se restablece al nivel de su control. En ambos tiempos post-SE no se observan diferencias entre ALSE vs RASE (g).



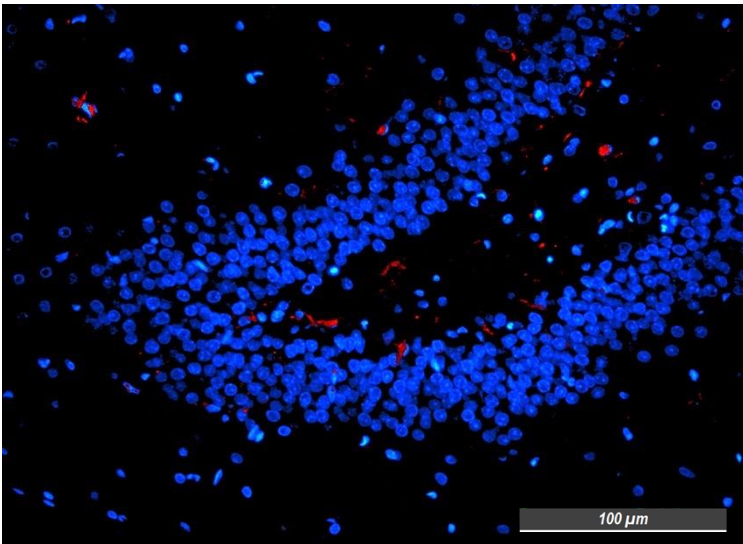
a.



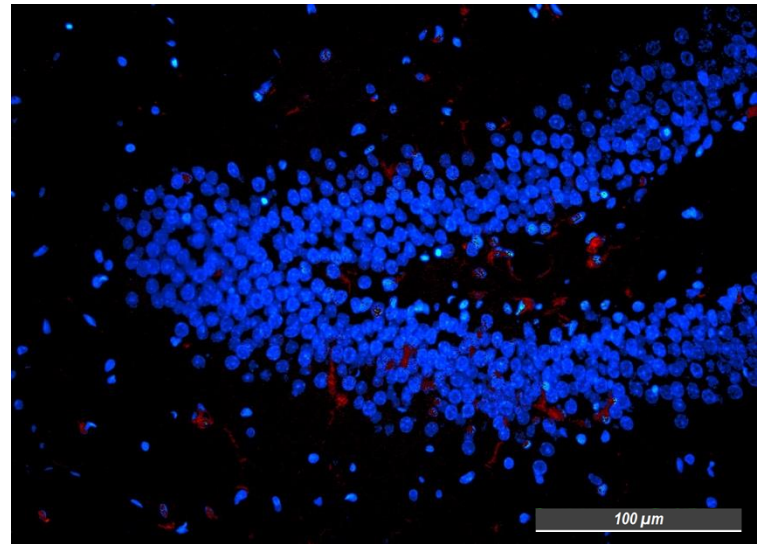
b.



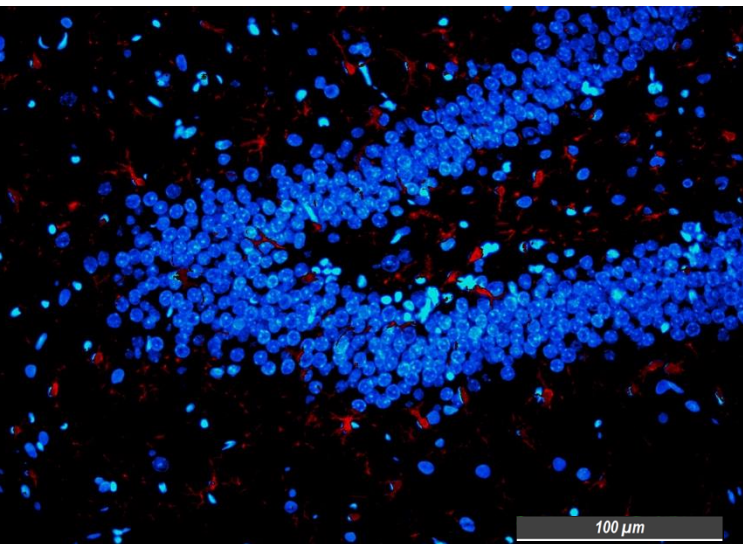
c.



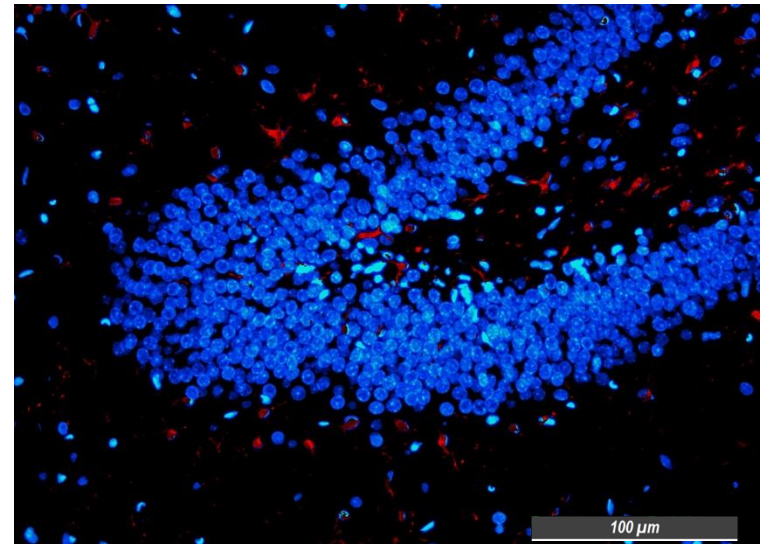
d.

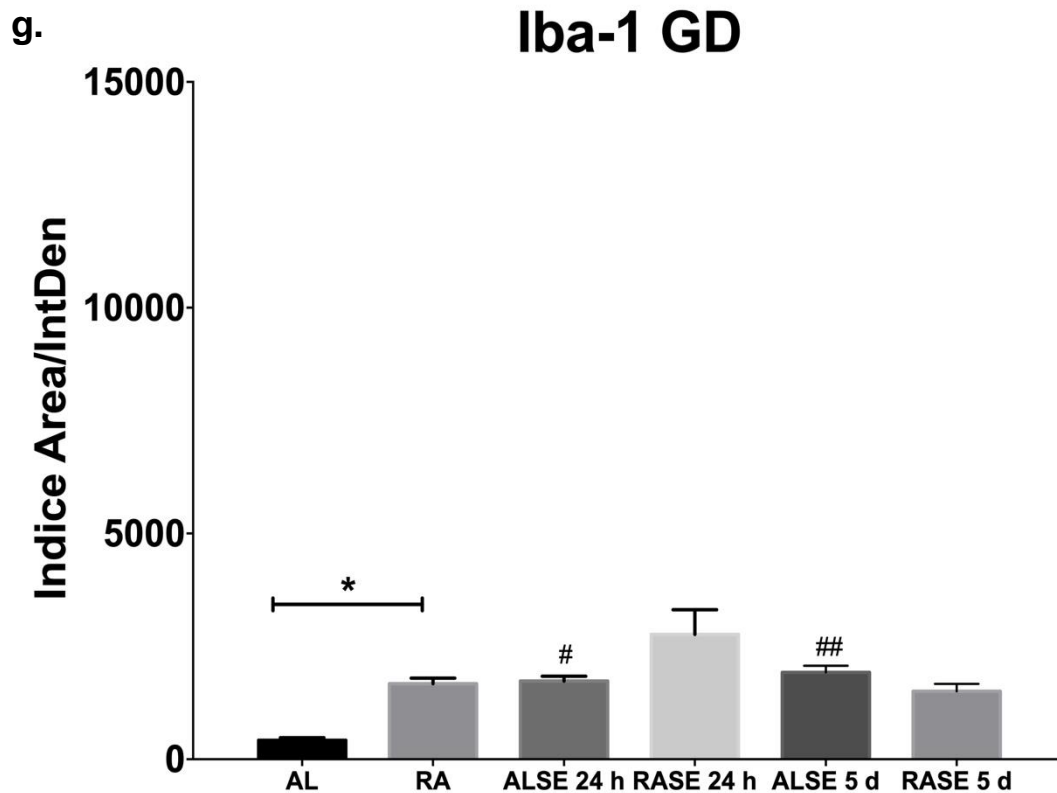


e.



f.





**Figura 20. Inmunofluorescencia de la microglía (Iba-1) en la región del giro dentado (GD).** De igual forma como en otras regiones del hipocampo, la RA también incrementa la cantidad de Iba-1 comparado contra AL. Posteriormente a las 24 h de la inducción del SE, ambos grupos incrementan la cantidad de microglía pero solo en el grupo ALSE (c) se puede apreciar una diferencia significativa con respecto a su control (AL); en cambio en el grupo RASE 24 h (d) aunque hay un aumento, este no es significativo contra RA (b). Finalmente, a los 5 días el grupo ALSE (e) mantiene niveles elevados de Iba-1 y el grupo RASE (f) recupera los niveles de su condición inicial RA (b). En color rojo se observan astrocitos (Iba-1) y en azul la marca contra núcleos (DAPI). Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \*, # ( $p \leq 0.05$ ); ## ( $p \leq 0.001$ );  $n=6$ . El símbolo # representa la diferencia significativa contra el grupo AL.

## 10. Resumen de resultados.

Con la finalidad de facilitar el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos, en esta sección se presenta una serie de tablas con los cambios observados en cada técnica utilizada, antes y después de la inducción del SE.

qRT-PCR	0 h	3 h	12 h	24 h	5 días
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	RA=AL	RASE>ALSE***	ALSE>RASE***	RASE>ALSE***	RASE=ALSE
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	RA=AL	RASE>ALSE***	RASE>ALSE***	RASE=ALSE	RASE=ALSE
<b>IL-6</b>	RA=AL	ALSE>RASE***	ALSE>RASE***	RASE=ALSE	RASE=ALSE
<b>NF<math>\kappa</math>B 1</b>	RA>AL	RASE>ALSE	RASE>ALSE	RASE=ALSE	RASE=ALSE
<b>NF<math>\kappa</math>B 2</b>	RA>AL	RASE>ALSE***	RASE>ALSE***	ALSE>RASE	RASE=ALSE
<b>CX3CL1</b>	RA>AL	RASE>ALSE	RASE>ALSE	RASE>ALSE	RASE=ALSE
<b>CXCL1</b>	RA=AL	ALSE>RASE***	ALSE>RASE***	ALSE>RASE***	RASE=ALSE
<b>CXCL10</b>	RA=AL	ALSE>RASE***	RASE>ALSE***	ALSE>RASE***	RASE>ALSE***
<b>IL-4</b>	RA=AL	RASE=ALSE	RASE=ALSE	RASE=ALSE	RASE=ALSE
<b>IL-10</b>	RA=AL	RASE=ALSE	RASE=ALSE	RASE=ALSE	RASE=ALSE

**Tabla 3. Expresión relativa de citocinas y quimiocinas.** Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ).

ELISA	0 h	3 h	12 h	24 h	5 días
IL-1 $\beta$	RA>AL	ALSE>RASE*	RASE>ALSE	ALSE>RASE	RASE>ALSE
TNF- $\alpha$	AL>RA	ALSE>RASE	ALSE>RASE	ALSE>RASE*	ALSE>RASE
IL-6	RA>AL	ALSE>RASE	RASE>ALSE	ALSE>RASE	RASE=ALSE

**Tabla 4. Cuantificación proteica de citocinas inflamatorias.** Se utilizó una ANOVA de dos vías con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ).

FluroJade C	0 h	24 h	5 días
CA1	RA=AL	ALSE>RASE	ALSE>RASE*
CA3	RA=AL	RASE>ALSE	ALSE>RASE
hilus	RA=AL	ALSE>RASE	ALSE>RASE*
GD	RA=AL	ALSE>RASE**	ALSE>RASE

**Tabla 5. Evaluación de muerte neuronal.** Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.001$ ).

GFAP	0 h	24 h	5 días
CA1	AL>RA****	ALSE>RASE****	ALSE>RASE****
CA3	RA=AL	ALSE>RASE****	ALSE>RASE****
hilus	RA>AL****	ALSE>RASE****	RASE>ALSE****
GD	RA>AL****	ALSE>RASE****	RASE=ALSE

**Tabla 6. Evaluación de gliosis reactiva.** Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \*\*\*\* ( $p \leq 0.00001$ ).

<b>Iba-1</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>5 días</b>
<b>CA1</b>	RA>AL **	ALSE>RASE**	ALSE>RASE****
<b>CA3</b>	RA>AL ***	RASE=ALSE	ALSE>RASE
<b>hilus</b>	RA>AL ****	RASE>ALSE	ALSE>RASE****
<b>GD</b>	RA>AL *	RASE>ALSE	ALSE>RASE

**Tabla 7. Evaluación de la microglía.** Se utilizó una ANOVA de una vía con prueba posterior de Tukey. Los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron como significativos. \* ( $p \leq 0.05$ ); \*\* ( $p \leq 0.001$ ); \*\*\* ( $p \leq 0.0001$ ); \*\*\*\* ( $p \leq 0.00001$ ).



## 11. Discusión.

La epilepsia continúa representando un problema de salud pública, aunado a los pocos avances generados en la síntesis de nuevos medicamentos el tratamiento es incierto. Las terapias metabólicas pueden ser una alternativa en el manejo conjunto para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, incluir este tipo de terapia en el tratamiento de la epilepsia, implica una valoración integral para reducir los efectos adversos. La restricción alimentaria podría ser una opción terapéutica. En estudios recientes se reveló el cambio metabólico que genera la RA; de igual forma se ha demostrado su beneficio cuando hay daño provocado por crisis epilépticas agudas (Landgrave-Gómez et al., 2016). Sin embargo, debido al corto periodo de duración de esta dieta restrictiva, no había sido investigado el estado de nutrición que podría generar, por lo que es importante evaluar si hay un cambio en su metabolismo que pueda generar una deficiencia de importancia clínica.

### 11.1 Efecto de la restricción alimentaria en el estado de nutrición.

La RA durante los primeros días de tratamiento muestra una disminución en el peso corporal de los animales y corresponde al periodo de adaptación al nuevo horario y esquema en que disponen del alimento (2 horas al día) como ya se ha descrito en otros trabajos.

Asimismo, al evaluar algunos marcadores séricos para tener una aproximación más precisa de lo que puede ocurrir al finalizar este régimen alimentario, se pudo

observar que no se producen cambios en la cantidad de albúmina, lo cual corrobora que no hay desnutrición crónica durante el periodo en el que es evaluado el tratamiento (20 días). Aunque se hayan observado diferencias significativas en los niveles de transtiretina, es importante mencionar que la dieta utilizada fue una dieta estándar, por lo que cabe la posibilidad de complementar la dieta con proteínas ricas en triptófano y así corregir este déficit, recordando que la transtiretina es una proteína rica en este aminoácido.

Como complemento para evaluar la desnutrición, se analizaron los parámetros hematológicos, en los cuales no se encontró evidencia de cambios significativos que pudieran reflejar un estado deletéreo (por ejemplo, anemia por deficiencias de hierro o vitamínicas). En este sentido, de acuerdo a reportes previos con el uso del mismo modelo alimentario, los parámetros evaluados en este trabajo, y tomando con reserva el hallazgo de la transtiretina baja en el grupo con RA, se demostró que la RA no produce un estado de desnutrición severo o que comprometa la salud del individuo durante los 20 días de duración, aunque no se descarta la necesidad de obtener mediciones antropométricas o séricas adicionales, para evaluar la función del sistema hepático (enzimas marcadoras de daño ALT, AST, GGT, fosfatasa alcalina, entre otros) y renal (depuración de creatinina, electrolitos séricos y urinarios, proteinuria, por mencionar algunos), y así descartar un déficit no previsto con lo encontrado en este proyecto.

## 11.2 Efecto de la restricción alimentaria en la producción de citocinas inflamatorias durante el SE.

Una vez que se observó que no hay una diferencia en el estado nutricional de los grupos con RA comparados con los grupos AL, se continuó con la evaluación del efecto positivo que tiene la RA para el control de las crisis epilépticas; planteando como posible mecanismo la regulación del proceso inflamatorio. Con respecto a la neuroinflamación, anteriormente se ha descrito que juega un papel muy importante en el proceso de la epileptogénesis y consecuentemente en el desarrollo de la epilepsia, por lo cual una intervención oportuna en este proceso podría representar una nueva medida terapéutica (Vezzani et al., 2015). Es por ello que el cambio evidente que produce la restricción alimentaria en el patrón de expresión tanto del transcrito como de la cantidad de proteína posterior a la aplicación del estímulo ictogénico juega un papel muy importante. Este cambio puede asociarse a los procesos epigenéticos que produce la RA, como el cambio sobre la desacetilación de histonas que puede favorecer la activación de vías de supervivencia (Landgrave-Gómez et al., 2016), permitiendo que esta readaptación metabólica resulte en un proceso de homeorrexis favorable y de esta manera obtener una respuesta eficiente ante un daño.

En cuanto a los resultados obtenidos con la cuantificación de la expresión génica y de la cuantificación de la proteína de las citocinas en hipocampo podemos destacar en primer lugar que la RA *per se* no produce un estado inflamatorio a nivel cerebral,

lo que es consistente con el incremento en CX3CL1, reflejando un estado de quiescencia entre microglía y neuronas en un tejido sano.

Posterior a la inducción del SE, la dinámica de expresión de citocinas proinflamatorias cambia en los animales que fueron tratados con RA. En los cuales, se ve un incremento en el transcrito de ciertos genes en la fase temprana (3 h), sin embargo, no se ve reflejado en la traducción a proteína. Estos resultados pudieran ser explicados por algunos aspectos particulares de cada uno.

En primer lugar, es importante remarcar que el transcrito cuantificado corresponde al de la (pro-IL-1 $\beta$ ), lo cual significa que no necesariamente todo el transcrito se traduce a proteína de manera efectiva y para este caso la RA podría aparentemente controlar mejor la producción de esta citocina durante el SE. Por otra parte, el BHB tiene un papel importante en la inhibición del inflammasoma evitando la escisión de la pro-interleucina 1 $\beta$  (pro-IL-1 $\beta$ ) en su forma activa (Goldberg et al., 2017). También es importante recordar que existen otros factores post-transcripcionales que regulan la expresión de esta y otras interleucinas, así como la activación del sistema inmune, como los micro-RNAs (miRNA) (Iyer et al., 2012). Los miRNA son una familia de mRNA pequeños no codificantes que sirven para controlar la sobreexpresión, eliminación o activación de mRNAs, al disminuir su estabilidad y de esta manera inhibir la traducción de múltiples proteínas (Yihong, 2018). Sin embargo, un control inadecuado de estos, también contribuye a la patogénesis de la epilepsia (Henshall et al., 2016). En este sentido, sería importante evaluar estas moléculas en

condiciones de RA, para ver su participación en la regulación de la expresión de estas citocinas.

Adicionalmente TNF- $\alpha$ , tiene una actividad dual en SNC, debido a que puede ser pro- y anti- convulsivante (Balosso et al., 2005), por lo cual, el aumento en la expresión de su transcrito no necesariamente representa un efecto negativo. Además, cabe señalar que la expresión de TNF- $\alpha$  está involucrada en mecanismos de supervivencia celular, dependiendo a cuál de sus receptores se una (Faustman & Davis, 2010), y en este sentido podría representar un efecto favorable el incremento del transcrito en el grupo RASE.

Como complemento a lo anterior, la cuantificación de NF $\kappa$ B reveló que los animales de los grupos RA y RASE tienen una mayor cantidad de transcrito en dos de sus componentes (p-50 y p-52). Esto sugiere que la dieta restrictiva *per se* tiene un efecto regulador en la expresión de dichos genes y que existe un mejor sistema de control o inhibición, puesto que no se ve reflejado este incremento de su transcrito con una elevación en los niveles de citocinas proinflamatorias y muerte neuronal, como se ha descrito en otros trabajos (Kim et al., 2013). Asimismo, al analizar este comportamiento en conjunto con la expresión de TNF- $\alpha$ , se puede explicar en parte el aumento de ambos genes de NF $\kappa$ B, ya que se ha informado que TNF- $\alpha$  induce la sobrerregulación de ambos (NF $\kappa$ B1 y NF $\kappa$ B2) (Schütze et al., 1995), por lo cual sería interesante evaluar la fosforilación de este factor nuclear y el resto de sus componentes proteicos durante la RA.

Adicionalmente, con la intención de evaluar el sistema antiinflamatorio, se midió el transcrito de dos citocinas (IL-4 e IL-10), las cuales no mostraron ningún cambio significativo a nivel cerebral, durante la evaluación del SE, demostrando a su vez que la RA por una parte no afecta la producción basal de estas interleucinas y por otro lado descarta que su efecto antiinflamatorio se deba a un incremento en estas. Sin embargo, medir la cantidad de TGF- $\beta$ , ampliaría la información obtenida acerca de la acción antiinflamatoria que pudiera generar la RA.

El efecto positivo de la RA sobre la regulación del proceso inflamatorio se vió apoyado con la reducción del transcrito de algunas quimiocinas proinflamatorias (CXCL1, CXCL10) implicadas en el reclutamiento del sistema inmune local y periférico. Esto podría sugerir que la RA durante las primeras 24 h post-SE, disminuye el reclutamiento de células inflamatorias periféricas hacia SNC, por lo que sería interesante abordar el estudio de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).

En cuanto a los niveles de CX3CL1, se sugiere que hay una mejor interacción entre microglía y neuronas, promovidos simplemente con la aplicación de la RA. Este incremento es importante porque favorece un estado de quiescencia en el tejido sano y además tiene un impacto positivo en presencia de un proceso de daño, como el SE.

Finalmente, a los 5 días, los niveles de transcrito de las tres citocinas se encuentran en niveles basales en ambos grupos y la producción de proteína se encuentra por debajo de los niveles basales en ambos grupos, esto puede deberse a que durante el periodo de latencia la respuesta inflamatoria es inestable (Vezzani et al., 2013).

Con todo lo anterior, este primer enfoque da una pauta para aplicar el estudio de la regulación post-transcripcional, post-transduccional y las respectivas vías de señalización de cada citocina (que no fueron estudiadas en este proyecto), y así mejorar el panorama del efecto protector y la regulación del proceso inflamatorio que promueve la RA.

11.3 Efecto de la restricción alimentaria en la muerte neuronal y gliosis reactiva durante el SE.

Finalmente, con los resultados obtenidos con la tinción de FluoroJade C podemos observar por un lado que la RA no produce una neurodegeneración por sí misma, y por otra parte, que la muerte neuronal es menor en los grupos con RA y SE, lo cual indica que este régimen alimentario puede promover cierto grado de neuroprotección, incluso en el periodo latente (5 días) en las cuatro regiones. Particularmente, en la región de CA3, no se aprecia ningún cambio significativo en los animales con RA y SE, esto puede corresponder a que esta región es más sensible durante las crisis epilépticas por la complejidad de sus conexiones con el resto del hipocampo (Traub et al., 1993; Knierim, 2015; Biagini et al., 2005). Es importante remarcar que la RA no elimina la muerte neuronal, pero si podría estar

generando un cambio lo suficientemente favorable en el hipocampo para reducirla, como la producción de factores de crecimiento (BDNF). En este sentido, Cheng y cols, demostraron que la dieta cetogénica produce la expresión del factor de crecimiento tipo insulina (Cheng et al., 2003). Asimismo, la dieta restrictiva podría proporcionar una mejor interacción entre neuronas y astrocitos, que como ya se ha mencionado en diversos estudios, es clave en el desarrollo de la epileptogénesis (Pekny et al., 2014; Gibbons et al., 2013; Wilcox et al., 2015; Seifert & Steinhäuser, 2013), lo que favorece una reducción en la muerte neuronal.

Por otro lado, podemos ver que la RA produce un aumento significativo en la marca contra GFAP en las regiones del hilus y GD sin generar la liberación de moléculas que alteren la homeostasis de las neuronas. Esto puede ser simplemente, en respuesta ante el estímulo de deprivación alimentaria como lo es el modelo utilizado en este proyecto, en este sentido la RA *per se* se representa un tipo de estrés leve (mild stress). También es importante mencionar que los astrocitos son el único subtipo celular capaz de hacer  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos en cerebro, de tal manera que su producción es importante para mantener la demanda energética del resto del tejido cerebral (neuronas, oligodendrocitos, microglia, etc) durante condiciones de ayuno (Edmond et al., 1987; Achanta & Rae, 2017). Esto podría explicar en parte porque el marcaje de astrocitos es mayor en el grupo RA.

Además, se ha reconocido la interacción de los astrocitos en la modulación de la actividad sináptica a través de una comunicación bidireccional entre neuronas y astrocitos, llamada sinapsis tripartita, en la cual los astrocitos participan de manera



activa liberando gliotransmisores (por ejemplo D-serina, ATP, adenosina, GABA y TNF- $\alpha$ ) que en condiciones fisiológicas contribuyen al mantenimiento de la homeostasis sináptica, y en condiciones patológicas favorecen la hiperexcitabilidad neuronal (Devinsky et al., 2013).

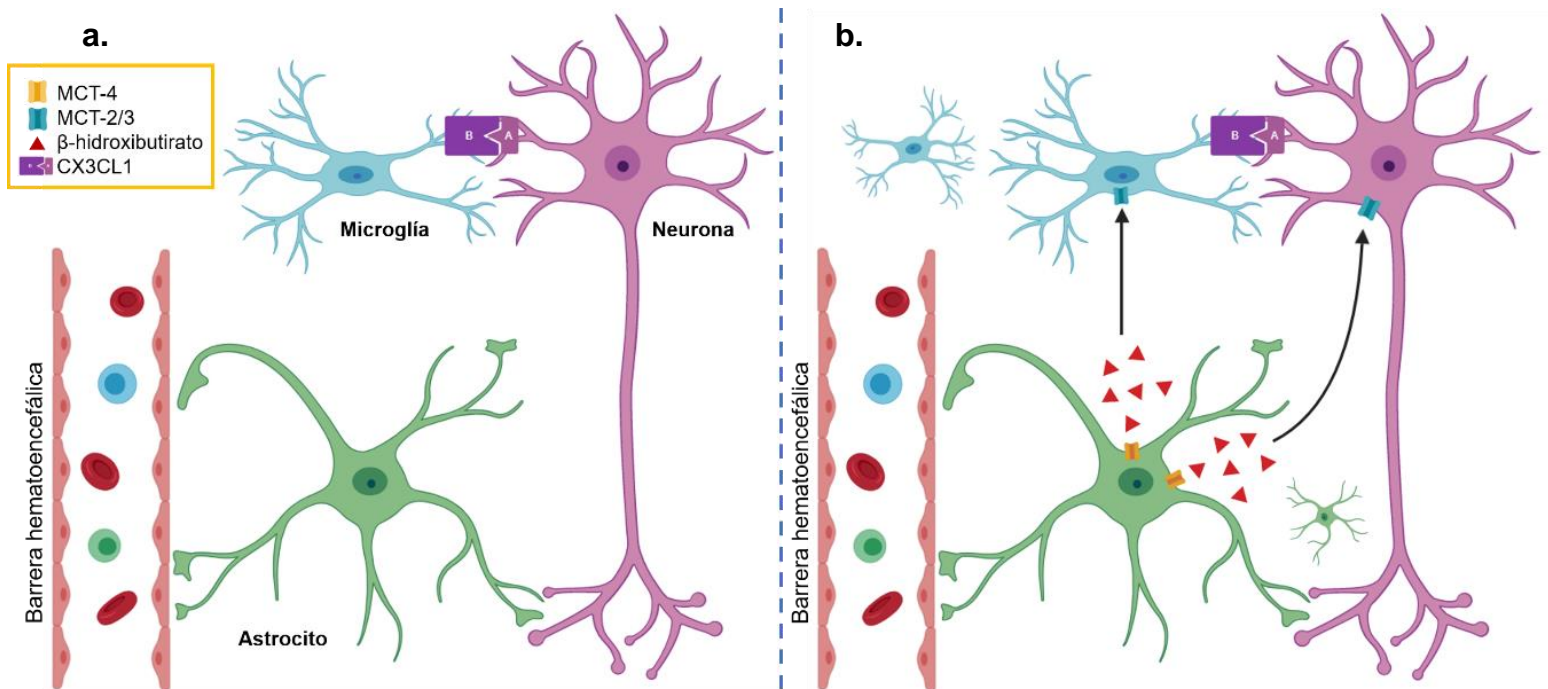
Por otra parte, el hecho de que su distribución se encuentre incrementada en estas regiones, podría contribuir a el efecto antiepiléptico, debido a que la vía de entrada del impulso epiléptico al hipocampo es a través de las conexiones entre la corteza entorrinal, el hilus y giro dentado (Alexander et al., 2016; Kuhn et al., 2018). Asimismo, desde las 24 h post-SE se puede observar como en los animales con RA se reduce la cantidad de la marca contra GFAP y durante el periodo latente el incremento en astrocitos respecto a lo generado durante el régimen alimentario es menor, en comparación con lo que ocurre en la condición AL, donde incrementa la marca contra GFAP desde las 24 h hasta los 5 días, además de que este incremento tiene una mayor proporción contra su cantidad inicial, previo a la inducción del SE. Adicionalmente se puede ver que la respuesta de la activación astrocítica con la RA es más eficiente en CA1, hilus y GD. Con estos resultados, se puede evidenciar que el aumento de los astrocitos en la RA tiene un papel importante cuando se induce el SE, lo cual contribuye a la reducción del daño neuronal producido por las crisis epilépticas agudas.

#### 11.4 Efecto de la restricción alimentaria sobre la microglía en el SE.

La cantidad de Iba-1 en los animales con RA incrementa de manera consistente en las 4 regiones del hipocampo; sin embargo, en el mRNA y la cantidad de proteína de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL6 no se observa ningún cambio con respecto al grupo AL, lo cual indica que probablemente ésta microglía no tiene un perfil inflamatorio durante la RA y se encuentra en homeostasis o quiescencia por la presencia de CX3CL1, manteniendo interacciones adecuadas con las neuronas. Posterior a la inducción del SE, se puede ver que a las 24 h la cantidad de microglía incrementa en ambos grupos y que no hay diferencias entre ambos (figuras 17-20). A diferencia de lo que ocurre en el periodo latente, en donde se refleja de mejor manera el efecto modulador de la RA sobre la microglía, principalmente en la región de CA1 e hilus, donde la activación microglial es mucho menor. Además, los incrementos entre los grupos AL vs ALSE son proporcionalmente mayores, en comparación con lo que ocurre en RA vs RASE.

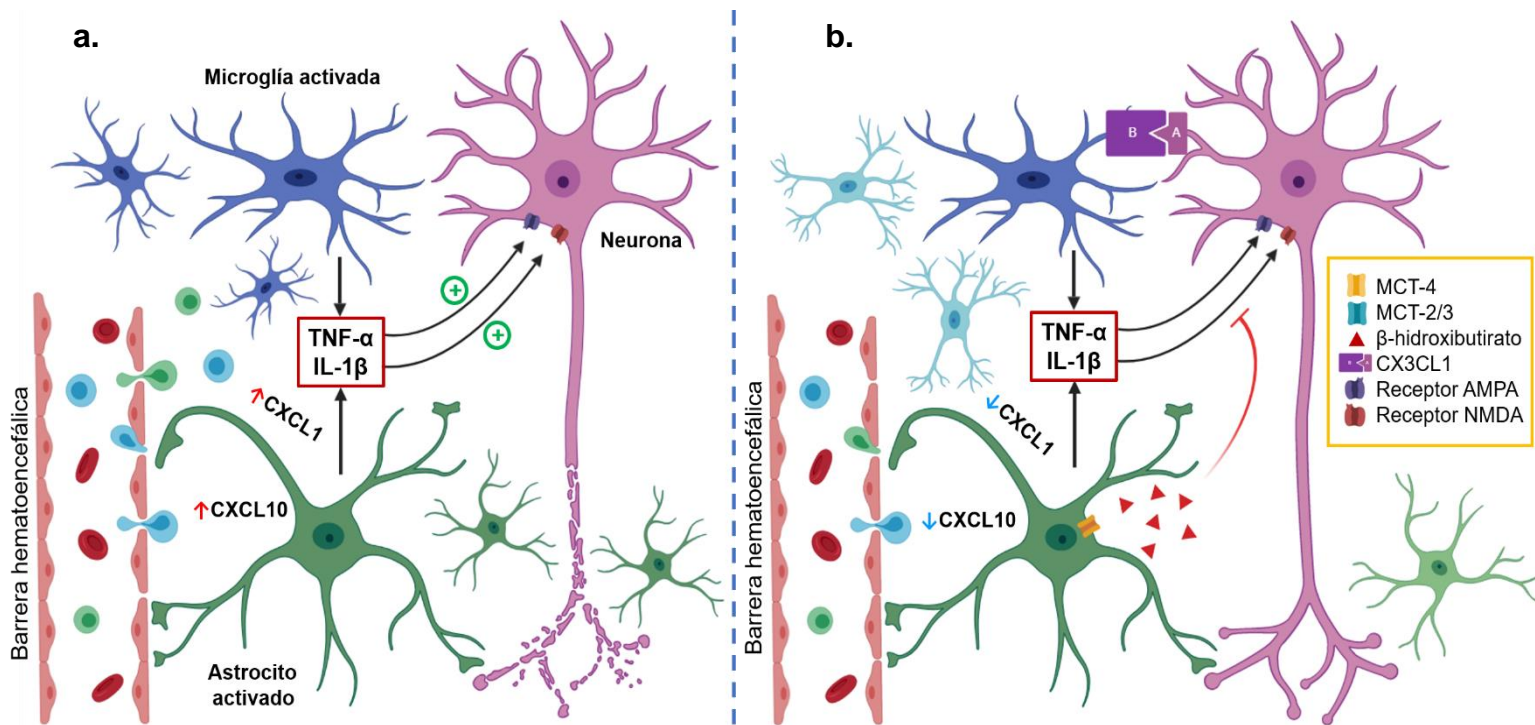
## 12. Integración.

Por último, en los Esquemas 5 y 6 se propone a integración de los resultados obtenidos. Por un lado (Esquema 5a), se muestran de manera muy general, las interacciones que ocurren en un tejido sano, en donde la correcta participación de astrocitos y microglía, dan lugar a un adecuado funcionamiento de las redes neuronales. Por otro lado, en el Esquema 5b, se representan las interacciones sugeridas durante la RA, en donde destaca el aumento de células microgliales no inflamatorias y astrocitos no activados, que mantienen el mismo proceso de homeostasis que el grupo AL.



**Esquema 5. Efecto de la restricción alimentaria en el hipocampo.** En (a) se pueden observar las interacciones normales entre neuronas-microglía-astrocitos en condiciones AL, y por otro lado en (b) se representan los cambios a los que conduce la aplicación de la dieta con RA.

Por otro lado, en el Esquema 6a, se esquematizan los principales cambios asociados a un SE, informados ampliamente en la literatura, y de los cuales solo se representan y se mencionan algunos: seguido a la inducción de un estímulo nocivo (en este caso un SE) hay una activación de microglía y astrocitos, lo cual altera las redes neuronales, al incrementar la producción de citocinas y quimiocinas, que en conjunto permeabilizan la BHE y reclutan al sistema inmune periférico y residente de SNC al sitio de la lesión; asimismo, se altera la homeostasis sináptica neuronal (por el aumento en la liberación de calcio, estimulación de receptores AMPA y NDMA por alteraciones en su conformación, inducidas por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  respectivamente) predisponiendo a cambios que producen excitotoxicidad y pueden progresar al desarrollo de epilepsia. En su contraparte, en el Esquema 6b se sugieren las modificaciones inducidas con la RA, como el aumento de la cantidad de CX3CL1; así como el posible mecanismo de acción en la modulación ante el daño provocado por el SE, para reducir la hiperexcitabilidad neuronal y promover el mantenimiento de la homeostasis neuronal, como la inhibición de IL-1 $\beta$  por parte del BHB, evitando la alteración de receptores NMDA y una disminución de quimiocinas, reduciendo la disrupción de la BHE.



**Esquema 6. Efecto de la restricción alimentaria durante el status epilepticus.** En (a) se pueden apreciar los cambios que surgen después de un estímulo ictogénico en condiciones AL, mientras que en (b) se proponen los cambios que contribuyen a reducir el daño inducido por el SE, mediados por el tratamiento previo con RA.

### **13. Conclusión.**

En conclusión, dichos resultados apuntan a que la restricción alimentaria no produce un efecto severo de desnutrición y además ejerce un cambio en la composición celular en estado quiescente (incremento en CX3CL1), lo cual tiene un efecto directo sobre la modulación del proceso neuroinflamatorio cuando se presenta un estímulo ictogénico (SE), además de participar activamente durante el periodo latente, disminuyendo la cantidad de IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL1 y CXCL10, que participan en este proceso. También se observa como modifica la cantidad y distribución del sistema inmune residente (astrocitos y microglía), propiciando una dinámica más estable en el manejo del proceso inflamatorio. Con los resultados obtenidos en este proyecto, se puede sugerir el uso de la restricción alimentaria como un tratamiento adyuvante en pacientes epilépticos de difícil control o de inicio reciente. De igual manera, sería de gran interés evaluar los mismos fenómenos en un curso temporal más prolongado o con un modelo de epilepsia crónica, con la finalidad de corroborar los hallazgos obtenidos en este trabajo.

## 14. Referencias.

- Achanta, L. B., & C. D. Rae. 2017.  $\beta$ -Hydroxybutyrate in the Brain: One Molecule, Multiple Mechanisms. *Neurochemical Research* 42(1):35-49.
- Alexander, A., M. Maroso, & I. Soltesz. 2016. Organization and control of epileptic circuits in temporal lobe epilepsy. *Progress in Brain Research* 226:127-54.
- AlQassmi, A., J. G. Burneo, R. S. McLachlan, & S. M. Mirsattari. 2016. Benign mesial temporal lobe epilepsy: A clinical cohort and literature review. *Epilepsy & Behavior* 65:60-64.
- Arellanes-Licea, E. del C., A. Baez-Ruiz, M. E. Carranza, C. Aramburo, M. Luna & M. Díaz-Muñoz. 2014. Daily Patterns and Adaptation of the Ghrelin, Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor-1 System Under Daytime Food Synchronisation in Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 26:282–295.
- Aronica, E., T. Ravizza, E. Zurolo, & A. Vezzani. Astrocyte Immune Responses in Epilepsy. 2012. *Glia* 60:1258–1268.
- Balosso, S., T. Ravizza, C. Perego, J. Peschon, I. L. Campbell, M. G. De Simoni, A. Vezzani. 2005. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. *Annals of Neurology* 57(6):804-12.
- Balosso, S., T. Ravizza, M. Pierucci, E. Calcagno, R. Invernizzi, G. Di Giovanni, E. Esposito & A. Vezzani. 2009. Molecular and functional interactions between tumor necrosis factor-alpha receptors and the glutamatergic system in the mouse hippocampus: implications for seizure susceptibility. *Neuroscience* 161(1):293-300.

- Becher, B., A. Prat, & J. P. Antel. 2000. Brain-Immune Connection: Immuno-Regulatory Properties of CNS-Resident Cells. *Glia* 29:293–304.
- Bellet, M. M., & P. Sassone-Corsi. 2010. Mammalian circadian clock and metabolism –the epigenetic link. *Journal of Cell Science* 123 (22):3837-3848.
- Berg, A. T. 2008. The natural history of mesial temporal lobe epilepsy. *Current Opinion in Neurology*. 21(2):173–178.
- Bharadwaj, S., S. Ginoya, P. Tandon, T. D. Gohel, J. Guirguis, H. Vallabh, A. Jevann, & I. Hanouneh. 2016. Malnutrition: laboratory markers vs nutritional assessment. *Gastroenterology Report* 4(4):272-280.
- Bielohuby, M., S. Sisley, D. Sandoval, N. Herbach, A. Zengin, M. Fischereder, D. Menhofer, B. J. M. Stoehr, K. Stemmer, R. Wanke, M. H. Tschöp, R. J. Seeley, & M. Bidlingmaier. 2013. Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. Vol. 305.
- Biagini, G., G. D'Arcangelo, E. Baldelli, M. D'Antuono, V. Tancredi, & M. Avoli. 2005. Impaired activation of CA3 pyramidal neurons in the epileptic hippocampus. *NeuroMolecular Medicine* 7(4):325-42.
- Brambilla, R., V. Bracchi-Ricard, W. H. Hu, B. Frydel, A. Bramwell, S Karmally, E. J. Green, & J. R. Bethea. 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine* 202(1):145-56.
- Burda, J. E., & M. V. Sofroniew. 2014. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 81(2):229-48.
- Cardona, A. E., E. P. Piro, M. E. Sasse, V. Kostenko, S. M. Cardona, I. M. Dijkstra, D. Huang, G. Kidd, S. Dombrowski, R. Dutta, J. C. Lee, D. N. Cook, S. Jung,



- Lira SA, D. R. Littman, R. M. Ransohoff. 2006. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience* 9(7):917-24.
- Cheng, C. M., B. Kelley, J. Wang, D. Strauss, D. A. Eagles, C. A. Bondy. 2003. A ketogenic diet increases brain insulin-like growth factor receptor and glucose transporter gene expression. *Endocrinology* 144(6):2676-82.
- Devinsky, O., A. Vezzani, S. Najjar, N. C. De Lanerolle, & M. A. Rogawski. 2013. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences* 36 (3):174-184.
- Duan, W., J. Lee, Z. Guo, & M. P. Mattson. (2001). Dietary Restriction Stimulates BDNF Production in the Brain and Thereby Protects Neurons Against Excitotoxic Injury. *Journal of Molecular Neuroscience*, 16(1), 1–12.
- Edmond, J., R. A. Robbins, J. D. Bergstrom, R. A. Cole, & J. de Vellis. 1987. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. *Journal of Neuroscience Research* 18(4):551-61.
- Eriksson, C., R. Tehrani, K. Iverfeldt, B. Winblad, M. Schultzberg. 2000. Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration. *Journal of Neuroscience Research* 60(2):266-79.
- Eyo, U. B., J. Peng, M. Murugan, M. Mo, A. Lalani, P. Xie, P. Xu, D. J. Margolis, L. J. Wu. 2017. Regulation of Physical Microglia-Neuron Interactions by Fractalkine Signaling after Status Epilepticus. *eNeuro* 10.1523/ENEURO.0209-16.2016.

- Faustman, D., M. Davis. 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* 9(6):482-93.
- Fisher, R. S., C. Acevedo, A. Arzimanoglou, A. Bogacz, J. H. Cross, C. E. Elger, J. Engel, L. Forsgren, J. A. French, M. Glynn, D. C. Hesdorffer, B. I. Lee, G. W. Mathern, S. L. Moshé, E. Perucca, I. E. Scheffer, T. Tomson, M. Watanabe, & S. Wiebe. 2014. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55 (4):475-482.
- Gibbons, M.B., R. M. Smeal, D. K. Takahashi, J. R. Vargas, & K. S. Wilcox. 2013. Contributions of astrocytes to epileptogenesis following status epilepticus: Opportunities for preventive therapy?. *Neurochemistry International* 63(7):660-669.
- Goldberg, E. L., J. L. Asher, R. D. Molony, A. C. Shaw, C. J. Zeiss, C. Wang, L. A. Morozova-Roche, R. I. Herzog, A. Iwasaki, & V. D. Dixit. 2017.  $\beta$ -Hydroxybutyrate Deactivates Neutrophil NLRP3 Inflammasome to Relieve Gout Flares. *Cell Reports* 18:2077–2087.
- He, H. Y. L. Ren, T. Guo, & Y. H. Deng. 2019. Neuronal autophagy aggravates microglial inflammatory injury by downregulating CX3CL1/fractalkine after ischemic stroke. *Neuronal Regeneration Research* 14(2): 280–288.
- Henshall, D. C., H. M. Hamer, R. J. Pasterkamp, D. B. Goldstein, J. Kjems, J. H. M. Prehn, S. Schorge, K. Lamottke & F. Rosenow. 2016. MicroRNAs in epilepsy: pathophysiology and clinical utility. *The Lancet Neurology* 15(13):1368-1376.
- Iyer, A., E. Zurolo, A. Prabowo, K. Fluiter, W. G. Spliet, P. C. van Rijen, J. A. Gorter & E. Aronica. 2012. *PloS One* 7(9):e44789.

- Johnson, E. A., T. L. Dao, M. A. Guignet, C. E. Geddes, A. I. Koemeter-Cox, & R. K. Kan. 2011. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1 $\alpha$  by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *Journal of neuroinflammation* 8, 41. doi:10.1186/1742-2094-8-41.
- Juge, N., J. A. Gray, H. Omote, T. Miyaji, T. Inoue, C. Hara, H. Uneyama, R. H. Edwards, R. A. Nicoll, & Y. Moriyama. 2010. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 68, 99–211.
- Kim, J.E., D. S. Kim, H. Jin Ryu, W. Il Kim, M. J. Kim, D. Won Kim, S. Young Choi, & T. C. Kang. 2013. The effect of P2X7 receptor activation on nuclear factor- $\kappa$ B phosphorylation induced by status epilepticus in the rat hippocampus. *Hippocampus* 23(6):500-14.
- Knierim, J. J. 2015. The hippocampus. *Current Biology* 25(23):R1116-21.
- Kuhn, T., J. M. Gullett, A. E. Boutzoukas, A. Bohsali, T. H. Mareci, D. B. FitzGerald, P. R. Carney, & R. M. Bauer. 2018. Temporal lobe epilepsy affects spatial organization of entorhinal cortex connectivity. *Epilepsy & Behavior* 88:87-95.
- Kwan, P., A. Arzimanoglou, A. T. Berg, M. J. Brodie, W. Allen Hauser, G. Mathern, S. L. Moshé, E. Perucca, S. Wiebe, & J. French. 2010. Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia* 51(6):1069-77.
- Landgrave-Gómez, J., O. F. Mercado-Gómez, M. Vázquez-García, V. Rodríguez-Molina, L. Córdova-Dávalos, V. Arriaga-Ávila, A. Miranda-Martínez, & R. Guevara-Guzmán. 2016. Anticonvulsant effect of time-restricted feeding in a

- pilocarpine-induced seizure model: Metabolic and epigenetic implications. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 10.
- Lee, J., Duan, W., J. M. Long, D. K. Ingram, & M. P. Mattson. 2000. Dietary Restriction Increases the Number of Newly Generated Neural Cells, and Induces BDNF Expression, in the Dentate Gyrus of Rats. *Journal of Molecular Neuroscience* 15(2), 99–108.
- Lorigados-Pedre, L., L. M. Morales-Chacón, S. Orozco-Suárez, N. Pavón-Fuentes, B. Estupiñán-Díaz, T. Serrano-Sánchez, I. García-Maeso, & L. Rocha-Arrieta. 2013. Inflammatory mediators in epilepsy. *Current Pharmaceutical Design* 19(38):6766-72.
- Loscher, W., H. Klitgaard, R. E. Twyman, & D. Schmidt. 2013. New avenues for antiepileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 12 (10):757-776.
- Lutas, A., & G. Yellen. 2013. The ketogenic diet: metabolic influences on brain excitability and epilepsy. *Trends in Neurosciences* 36 (1):32-40.
- Ma, W., J. Berg, G. Yellen. 2007. Ketogenic diet metabolites reduce firing in central neurons by opening K(ATP) channels. *The Journal of Neuroscience* 27(14):3618-25.
- Ma, Y. 2018. The Challenge of microRNA as a Biomarker of Epilepsy. *Current Neuropharmacology* 16(1):37-42.
- Masino, S. A., & Rho J. M. 2012. Mechanisms of ketogenic diet action. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*, 4th ed Bethesda (MD), USA: National Center for Biotechnology Information (US).

- Mattson, M. P., W. Duan, & Z. Guo. 2003. Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Neurochemistry* 84(3), 417–431.
- Mizuno, T., J. Kawanokuchi, K. Numata, A. Suzumura. 2003. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Research* 979(1-2):65-70.
- Nei, M., L. Ngo, J. I. Sirven, & M. R. Sperling. 2014. Ketogenic diet in adolescents and adults with epilepsy. *Seizure* 23 (6):439-442.
- Niu F., K. Liao, G. Hu, S. Sil, S. Callen, M. L. Guo, L. Yang, & S. Buch. 2019. Cocaine-induced release of CXCL10 from pericytes regulates monocyte transmigration into the CNS. *Journal of Cell Biology* doi: 10.1083/jcb.201712011.
- Panov A., Z. Orynbayeva, V. Vavilin, V. Lyakhovich. 2014 Fatty Acids in Energy Metabolism of the Central Nervous System. *Biomed Research International* 2014:472459.
- Patterson K. P., G. P. Brennan, M. Curran, E. Kinney-Lang, C. Dubé, F. Rashid, C. Ly, A. Obenaus, & T. Z. Baram. 2015. Rapid, Coordinate Inflammatory Responses after Experimental Febrile Status Epilepticus: Implications for Epileptogenesis. *eNeuro* 9;2(5).
- Pekny M., U. Wilhelmsson, M. Pekna. 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters* 565:30-8.
- Pérez-Mendoza, M., J. B. Rivera-Zavala & M. Díaz-Muñoz. 2014. Daytime restricted feeding modifies the daily variations of liver gluconeogenesis: Adaptations in

- biochemical and endocrine regulators. *Chronobiology International* 31(7): 815–828.
- Rana, A. & A. E. Musto. 2018. The role of inflammation in the development of epilepsy. *Journal of neuroinflammation* 15(1):144.
- Rivera-Zavala, J. B., A. Báez-Ruiz, & M. Díaz-Muñoz. 2011. Changes in the 24 h Rhythmicity of Liver PPARs and Peroxisomal Markers When Feeding Is Restricted to Two Daytime Hours. *PPAR Research* Volume 2011:11 pages.
- Rivera-Zavala, J. B., C. Molina-Aguilar, M. Pérez-Mendoza, M. Olguín-Martínez, R. Hernández-Muñoz, G. A. Báez-Ruiz & M. Díaz-Muñoz. 2017. Daytime restricted feeding modifies the daily regulation of fatty acid  $\beta$ -oxidation and the lipoprotein profile in rats. *British Journal of Nutrition* page 1 of 12.
- Rizza, W., N. Veronese, & L. Fontana. 2014. What are the roles of calorie restriction and diet quality in promoting healthy longevity?. *Ageing Research Reviews* 13:38–45.
- Rosell, D. R., J. Nacher, K. T. Akama, B. S. McEwen. 2003. Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation. *Neuroscience* 122 (2003) 329–348.
- Salter, M., & S. Beggs. 2014. Sublime Microglia: Expanding Roles for the Guardians of the CNS. *Cell* 158(1):15-24.
- Schütze, S., K. Wiegmann, T. Machleidt, & M. Krönke. 1991. TNF-induced activation of NF-kappa B. *Immunobiology* 193(2-4):193-203.

- Scorza, F. A., R. M. Arida, M. d. G. Naffah-Mazzacoratti, D. A. Scerni, L. Calderazzo, & E. A. Cavalheiro. 2009. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 81:345-365.
- Seifert, G., G. Carmignoto, & C. Steinhäuser. 2010. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Research Reviews* 63(1-2):212-221  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.10.004>.
- Seifert, G., & C. Steinhäuser. 2013. Neuron-astrocyte signaling and epilepsy. *Experimental Neurology* 244:4-10. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.08.024.
- Shapiro, L. A., L. Wang, & C. E. Ribak. 2008. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia* 49 Suppl 2:33-41.
- Sofroniew, M. V. 2014. Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *The Neuroscientist* 20(2):160-72.
- Sofroniew, M. V. 2015. Astrogliosis. *Cold spring Harbor Perspectives in Biology* 7(2):a020420.
- Staley, K. 2015. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci* 18 (3):367-372.
- Stellwagen, D., E. C. Beattie, J. Y. Seo & R. C. Malenka RC. 2005. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Neuroscience* 25(12):3219-28.
- Tao, A. F., Z. H. Xu, B. Chen, Y. Wang, X. H. Wu, J. Zhang, Y. S. Tang, C. L. Xu, H. W. Zhao, W. W. Hu, L. Y. Shi, S. H. Zhang & Z. Chen. 2015. The Pro-inflammatory Cytokine Interleukin-1 $\beta$  is a Key Regulatory Factor for the

- Postictal Suppression in Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 21:642–650.
- Taub, D.D., A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin, J. J. Oppenheim. 1993. Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *Journal of Experimental Medicine* 177(6):1809-14.
- Trinka, E., H. Cock, D. Hesdorffer, A. O. Rossetti, I. E. Scheffer, S. Shinnar, S. Shorvon, & D. H. Lowenstein. 2015. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56 (10):1515-1523.
- Vezzani, A., A. Friedman, & R. J. Dingledine. 2013. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology* 69:16-24.
- Vezzani, A., B. Lang, & E. Aronica. 2015. Immunity and Inflammation in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(2):a022699.
- Viggiano, A., R. Pilla, P. Arnold, M. Monda, D. D'Agostino, P. Zeppa, & G. Coppola. 2016. Different calorie restriction treatments have similar anti-seizure efficacy. *Seizure* 35:45–49.
- Wanner, I. B., M. A. Anderson, B. Song, J. Levine, A. Fernandez, Z. Gray-Thompson, Y. Ao, & M. V. Sofroniew. 2013. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury. *The Journal of Neuroscience* 33(31):12870 –12886.



- Weiss, D.J., K. J. Wardrop, & O. W. Schlam. 2010. Schalm's Veterinary Hematology 6th ed. Ames, Iowa : Wiley-Blackwell.
- Wetherington, J., G. Serrano, & R. Dingledine. 2008. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58(2), 168-78.
- Wheless, J. W. 2008. History of the ketogenic diet. *Epilepsia* 49 Suppl 8:3-5.
- Wilder, R. M. 1921. The effects of ketonemia on the course of epilepsy. *Mayo Clin Proc* 1921;2:307–308.
- Wilcox, K. S., J. M. Gee, M. B. Gibbons, P. Tvrdik, & J. A. White. 2015. Altered structure and function of astrocytes following status epilepticus. *Epilepsy & behavior : E&B* 49, 17-9.
- Yeo, S. I., J. E. Kim, H. J. Ryu, C. H. Seo, B. C. Lee, I. G. Choi, D. S. Kim, & T. C. Kang. 2011. The roles of fractalkine/CX3CR1 system in neuronal death following pilocarpine-induced status epilepticus. *Journal of Neuroimmunology* 234 (2011) 93–102.
- Youm, Y.-H., K. Y. Nguyen, R. W. Grant, E. L. Goldberg, M. Bodogai, D. Kim, D. D'Agostino, N. Planavsky, C. Lupfer, T. D. Kanneganti, S. Kang, T. L. Horvath, T. M. Fahmy, P. A. Crawford, A. Biragyn, E. Alnemri, & V. D. Dixit. 2015. Ketone body  $\beta$ -hydroxybutyrate blocks the NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease. *Nature medicine* 21 (3):263-269.
- Ziebell, J. M., P.D. Adelson, & J. Lifshitz. 2015. Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury. *Metabolic Brain Disease* 30(2):393-400.

Zujovic, V., J. Benavides, X. Vigé, C. Carter, V. Taupin. 2000. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 29(4):305-15.